

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Dekan Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Galectin-3 und seine Bedeutung
bei der Stromareaktion von Tumoren

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Magdalena Hahn

2011

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Dekan Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Galectin-3 und seine Bedeutung
bei der Stromareaktion von Tumoren

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Magdalena Hahn

2011

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Edinger

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Einleitung	7
1.1 Hintergrund und Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe	7
1.2 Der Aufbau der Darmwand	7
1.3 Grundlagen zu Tumoren	9
1.3.1 Definition	9
1.3.2 Entstehung von Tumoren	10
1.3.3 Entstehung von Metastasen	11
1.4 Das kolorektale Karzinom	12
1.5 Galectin-3	14
1.5.1 Galectine allgemein	14
1.5.2 Struktur und Aufbau von Galectin-3	15
1.5.3 Expression, Sekretion und Funktion von Galectin-3	16
1.5.4 Galectin-3 und Tumore	18
Arbeitsziele	19
Materialien	20
3.1 Immunhistologie	20
3.2 Verbrauchsmaterialien	20
3.3 Geräte	21
Methoden	22
4.1 Immunhistologie	22
4.2 Statistik	25
Ergebnisse	27
5.1 Expression von Galectin-3 im gesunden Darmgewebe	27
5.2 Expression von Galectin-3 im Tumorgewebe	30
5.3 Desmoplasie und eine Korrelation zur Galectin-3-Expression	31
Diskussion	38
6.1 Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel und Tumorepithel	38
6.2 Galectin-3 und Tumoren	40
6.3 Ausblick	41
6.4 Zusammenfassung	43
Literaturverzeichnis	45
Abbildungsverzeichnis	47

Tabellenverzeichnis.....	47
Danksagung	48

Abkürzungsverzeichnis

ABC	= Avidin-Biotin-Complex
CEC	= Kolonepithelzellen (Colonic Epithelial Cells)
CRD	= Carbohydrate-recognition-domain
DNA	= Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribo Nucleic Acid)
ER	= endoplasmatisches Retikulum
FAP	= familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	= Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
Gal-3	= Galectin-3
HNPCC	= hereditäry non-polyposis colorectal carcinoma
5-JÜR	= Fünfjahresüberlebensrate
kb	= Kilobite
kDa	= Kilodalton
MCP	= modifiziertes Citrus-Pectin
PBS	= Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphat Buffered Saline)

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit aus dem Bereich der Inneren Medizin, mit Unterstützung durch die Pathologie, sollten die Auswirkungen von Galectin-3 auf die Stromareaktion von Tumoren untersucht werden.

1.1 Hintergrund und Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe

In Voruntersuchungen wurde der Effekt konditionierter Medien, die aus primären Kolonepithelzellen (CEC) gewonnen wurden, auf intestinale Fibroblasten untersucht. Hierbei konnte eine, durch CEC ausgelöste, starke Aktivierung und Stimulation von intestinalen Fibroblasten nach 24-stündiger Inkubation festgestellt werden.

Anschließend konnte mittels Proteinausfällung, Gelelektrophorese und Proteinsequenzierung Galectin-3 als Protein in den konditionierten Medien ermittelt und letztendlich als verantwortlicher, von Epithelzellen sezernierter, stark Fibroblasten stimulierender Faktor identifiziert werden.

Hieraus erwuchs die Frage nach Reaktionen, ausgelöst durch Galectin-3, nicht nur im gesunden, sondern auch im pathologisch veränderten Gewebe. Solches findet man z. B. in der Nachbarschaft von Krebszellen, die in dem sie umgebenden Gewebe Stromareaktionen auslösen. So fiel die Entscheidung, den beobachteten Effekt von Galectin-3 auch im Zusammenhang mit Tumorgewebe, speziell dem Kolonkarzinom, zu untersuchen.

1.2 Der Aufbau der Darmwand

Die Darmwand besteht in der Regel aus vier Schichten, die sich von außen nach innen wie folgt gliedern: die Serosa als Bindegewebsschicht, die Muskularis, eine Muskelschicht, die Submukosa und die Mukosa, also die Schleimhaut.

Letztere besteht ihrerseits wieder aus mehreren Schichten und zwar der Lamina epithelialis mukosae (Epithel) (EM), der Lamina propria mukosae (Bindegewebe) (PM) und der Lamina muskularis mukosae (MM).

Im Dickdarm hat die Schleimhaut, im Gegensatz zum Dünndarm, keine Zotten, dafür aber dicht nebeneinander stehende, tiefe Einstülpungen, die sogenannten Krypten. Das hochprismatische Epithel der Dickdarmschleimhaut enthält neben den resorbierenden Mukosazellen sehr viele schleimproduzierende Becherzellen.

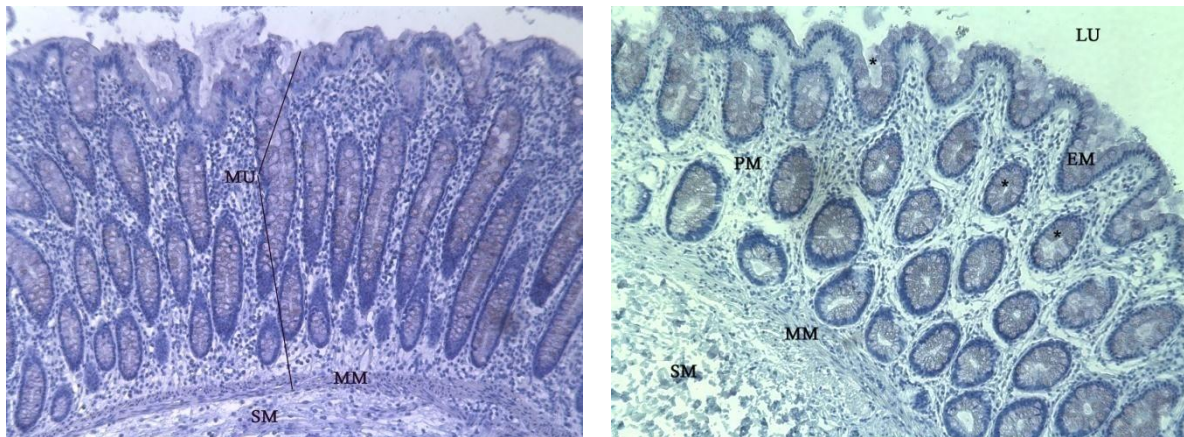


Abbildung 1: Gesunde Darmschleimhaut 1

Auf den hier abgebildeten Schnitten ist die Mukosa (MU) mit ihren 3 Schichten der Lamina epithelialis mukosae (EM), der Lamina propria mukosae (PM) und der Lamina muskularis mukosae (MM) zu sehen. Außerdem sind die Submukosa (SM) und das Darmlumen (LU) angeschnitten.

Gut sind die zahlreichen längs und quer geschnittenen Krypten (*) zu erkennen.

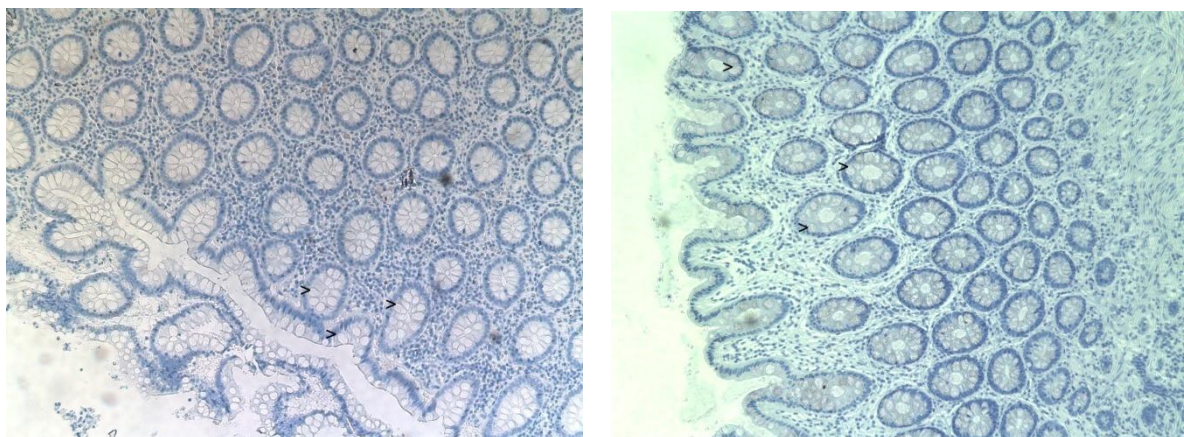


Abbildung 2: Gesunde Darmschleimhaut 2

Hier erkennt man gut die um die Kryptenlichtung angeordneten Becherzellen (>), ihre Zellkerne und die dazwischen liegenden Mukosazellen sind basal angeordnet. Zwischen den Krypten befindet sich die Lamina propria mukosae.

Links ist wieder das Darmlumen, rechts die Submukosa angeschnitten.

Im tumorös veränderten Gewebe ist dieser gegliederte Aufbau der Darmwand nicht mehr zu erkennen (siehe Abbildung 3).

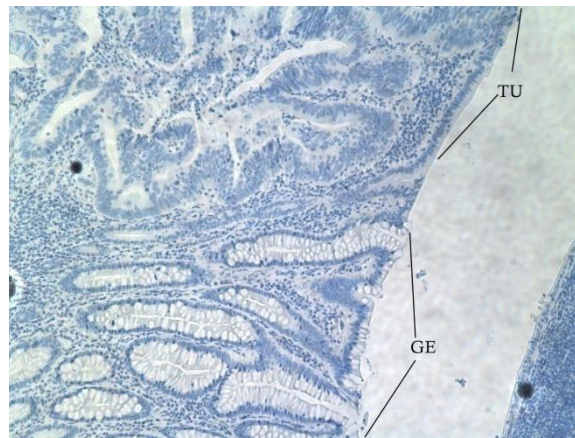


Abbildung 3: Tumorgewebe

Im unteren Bildteil ist gesundes Darmepithel zu sehen (GE), im oberen hingegen tumorös verändertes Epithel (TU), das sich deutlich weniger am Darmlumen orientiert. Die „Tumorkrypten“ sind nicht mehr klein, kompakt und dicht gedrängt, sondern zeigen eher einen lockeren und unstrukturierten Aufbau.

1.3 Grundlagen zu Tumoren

1.3.1 Definition

Der Begriff Tumor (von lat.: tumor, -oris (n)) ist ein sehr unscharfer Begriff und bedeutet zunächst nur Schwellung oder Geschwulst, meint also in der Medizin jegliche Raumforderung.

Unter Tumor im engeren Sinne versteht man Neubildungen (Neoplasien) von Körpergewebe durch Fehlregulation des Zellwachstums, die gutartig oder bösartig sein können. (1)

Man unterscheidet bei Neoplasien hinsichtlich ihrer Dignität (Wertigkeit) zwischen benignen = gutartigen, semimaligen (haben Merkmale von gut- und bösartigen Tumoren) und malignen = bösartigen Tumoren. Dabei bezeichnet man maligne Tumoren mesenchymaler Zellen als Sarkome, solche epithelialer Zellen als Karzinome.

Zur weiteren Einteilung von Tumoren verwendet man zum Einen das Staging (Einteilung nach Fortschritt der Ausbreitung) und zum Anderen das Grading (Grad der feingeweblichen Entdifferenzierung). Zur Beurteilung des Staging wird bei soliden Tumoren die TNM-Klassifikation angewandt (T=Größe bzw. Eindringtiefe ins Gewebe,

N=regionärer Lymphknotenbefall, M=Existenz von Metastasen). Beim Grading wird der Schweregrad der Abwandlung der Tumorzelle von der Ursprungszelle angegeben. (1)

1.3.2 Entstehung von Tumoren

Wachstum, Teilung und Zerstörung von Zellen sind in gesundem Gewebe aufeinander abgestimmt. Bei Krebszellen ist diese Abstimmung nicht mehr erhalten und findet unkontrolliert statt, da meist hierfür benötigte genetische Codes defekt sind.

Sogenannte Onkogene und Tumorsuppressorgene sind für die Konstanthaltung des genetischen Codes bei der Zellteilung verantwortlich. Sie leiten sowohl Reparaturvorgänge als auch einen eventuell nötigen Zelltod (Apoptose) ein.

Die derzeit plausibelste Theorie der Krebsentstehung (Karzinogenese) besagt, dass Kopierfehler - oder seltener bereits angeborene Schäden - in diesen „Wächtergenen“ zu weiteren Defekten in nachfolgenden Zellgenerationen führen, wobei sich die Effekte potenzieren, wenn mehrere „Wächtergene“ beschädigt sind.

Wenn letztendlich Zelltod-einleitende Gene (z. B. p53) betroffen sind, werden so entartete Zellen nicht mehr durch zelleigene Apoptose eliminiert.

Heute wird zumeist ein Mehrstufenmodell der Krebsentstehung favorisiert.

Der erste Schritt besteht dabei in der so genannten Initiierung. Hierbei kommt es zu irreversiblen molekularen, nicht sichtbaren DNS-Veränderungen der Zelle (sog. zelluläre Transformation), welche an die Tochterzellen weitergegeben werden und so die Ursache dafür darstellen, dass eingeleitetes Wachstum auch nach Beendigung des auslösenden Reizes anhält. Im zweiten Schritt, der Jahre bzw. Jahrzehnte dauernden Latenzperiode, folgen Wachstum und Selektion der primär initiierten Zellen, wobei sich schließlich sichtbare zelluläre Veränderungen aufzeigen, also Tumorzellen entstehen. Es findet beispielsweise keine Ausbildung interzellulärer Verbindungsbrücken im Vergleich zu normalen Zellen mehr statt. Weiterhin kommt es zur Aufhebung des Einschichtenwachstums sowie zu Oberflächenveränderungen. Erst jetzt wird der Tumor nachweisbar, was den letzten Schritt in der Karzinogenese darstellt.

Diese sogenannten Transformationsphänomene spielen bei der Metastasierung eine entscheidende Rolle.

1.3.3 Entstehung von Metastasen

Die drei Grundeigenschaften überschießendes und reizunabhängiges Wachstum sowie unkoordiniertes Umgebungsverhalten (z.B. Differenzierungsverlust) stellen die Charakteristika von Tumoren dar. Im weiteren Verlauf erfolgt bei malignen Tumoren infiltrierendes Wachstum und Metastasierung. (2)

Die Metastasierung ist zweifelsfrei die entscheidende biologische Eigenschaft, die malignes Wachstumsverhalten charakterisiert. Tumormetastasierung und -invasion sind dabei untrennbar miteinander verbunden. (3)

Der Begriff Invasion meint in neuerer Zeit den Durchtritt von malignen Tumorzellen durch Membranen, etwa die Basalmembran von Lymph- oder Blutgefäßen.

Mehrere Schritte sind nötig, bis letztendlich eine Metastasenbildung eintritt:

Nach der sog. Ablösung der Tumorzellen vom Primärtumor, welche als Phänomen der zellulären Transformation in Folge mangelnder Interzellularverbindungen entsteht, folgt im zweiten Schritt die Invasion.

Eine invasive Tumorzelle ist in der Lage, die Basalmembranen zu durchbrechen. (4)

Durch Substitution proteolytischer Enzyme werden die Membranen zerstört und die Krebszelle wandert aktiv in Blut- und Lymphgefäße ein.

Nachdem die Geschwulstzellen ins Gefäßsystem invadiert sind, können sie sich am Verschleppungsort neu ansiedeln, woran viele verschiedene Faktoren der Tumorzellen und des Wirtes, einschließlich immunologischer Bedingungen desselben, beteiligt sind.

(siehe auch Abb. 1)

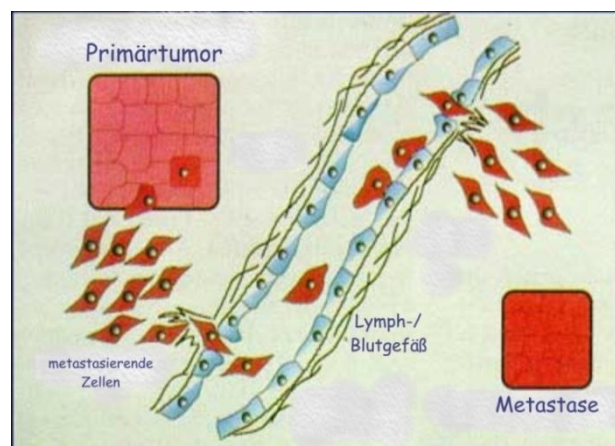


Abbildung 4: Metastasierung von Tumorzellen

Die Metastasierung (systemische Dissemination) von Tumorzellen erfolgt in mehreren Schritten. Durch den Verlust von Adhäsionsmolekülen lösen sich die Tochterzellen vom Primärtumor, um mit Hilfe von Proteasen und „Mobilitätsfaktoren“ in Blut- und Lymphgefäße einzudringen und zu neuen Standorten verschleppt zu werden, wo sie als Metastasen in Erscheinung treten.

1.4 Das kolorektale Karzinom

Da in dieser Arbeit nur Schnitte von Kolonkarzinomen verwendet wurden, soll darauf kurz näher eingegangen werden.

Das kolorektale Karzinom stellt die zweithäufigste Tumorerkrankung des Menschen dar. Es ist weiterhin ein Malignom der Zivilisation und des höheren Lebensalters, mit einem Altersgipfel um das 70. Lebensjahr. 40% des kolorektalen Karzinoms entfallen auf das Rektum, während 60% im Kolon lokalisiert sind. (5)

Etwa 15% der Krebstodesfälle gehen auf das kolorektale Karzinom zurück. Man geht davon aus, dass 90% der kolorektalen Karzinome sporadisch auftreten, während 10% durch eine meist vererbte Keimbahnmutation bedingt sind (5) (FAP = familiäre adenomatöse Polyposis und HNPCC = hereditär non-polyposis colorectal carcinoma).

Über 95% aller Kolonkarzinome gehen aus einem Adenom hervor (6) (Adenom – Karzinom – Sequenz). Beim kolorektalen Karzinom finden sich häufig Adenomreste (5); das Risiko eines invasiven Karzinoms steigt mit zunehmender Größe des Adenoms. Es wird angenommen, dass das kolorektale Karzinom über mehrfache genetische Schritte mit genetischen Veränderungen der chromosomalen DNA entsteht.

Genaue Ursachen der Entstehung sind unbekannt. Als Risikofaktoren kommen sowohl Ernährungsfaktoren in Betracht als auch genetische Disposition; besonders gefährdet sind Patienten mit Polyposen. (5) Auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen, sowie Mamma-, Ovarial- und Uteruskarzinom spielen eine Rolle.

Histologisch unterscheidet man zwischen den vier Differenzierungsgraden (Grading) „gut differenziert“ = 1, „mäßig differenziert“ = 2, „schlecht differenziert“ = 3 und „entdifferenziert“ = 4. Die Stadieneinteilung (Staging) des Kolonkarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation und/oder nach Dukes. (7) (siehe Tabelle 1)

TNM-Klassifikation	Dukes-Stadium	Tumorausdehnung	5-JÜR
Tis		Carcinoma in situ(Muscularis mucosae nicht durchbrochen)	100%
T ₁₋₂ N ₀ M ₀	A	Beschränkung auf Mucosa, Submucosa	>90%
T ₂₋₃ N ₀ M ₀	B1	Infiltration der Muscularis propria	85%
T ₃ N ₀ M ₀	B2	Infiltration aller Wandschichten incl. Serosa	70%
T _{x-4} N ₁₋₃ M ₀	C	Infiltration von Nachbarstrukturen und lokalen Lymphknoten	30%
T _x N _x M ₁	D	Fernmetastasen	5%

Tabelle 1: Stadieneinteilung und Prognose des Kolonkarzinoms

Die Tabelle zeigt die Tumorausdehnung im jeweiligen Stadium, sowie die entsprechende Prognose in Form der 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR)

N₀ bzw. M₀ bedeutet keine Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen, T_x bzw. N_x bedeutet jegliches T- bzw. N-Stadium

Klinisch können Blut im Stuhl (sichtbar oder okkult), Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Leibschmerzen, Gewichtsverlust, Leistungsschwäche, Anämie sowie gelegentlich unklares Fieber auf ein kolorektales Karzinom hindeuten. (6) Größere Kolontumoren können durch die Bauchwand als walzenförmige Resistenz tastbar und auch sonographisch erfassbar werden. (5)

Zu den Komplikationen zählen Obstipation, Blutungen, Perforation mit Abszess- und/oder Fistelbildung (5) sowie Metastasierung per continuitatem in Nachbarorgane oder über Lymph- und Blutgefäße, bevorzugt in lokale Lymphknoten und die Leber.

Therapeutisch wird eine En-bloc-Resektion mit Entfernung des regionalen Lymphabflussgebiets angestrebt. (6) Durch adjuvante Radiatio- bzw. Chemotherapie ab Stadium Dukes B (siehe Tabelle 1.1) lässt sich manchmal die Überlebensrate verbessern. In fortgeschrittenen, nicht mehr kurativ operablen Stadien ist beim Kolonkarzinom nur noch eine palliative Therapie möglich. (7)

Die Prognose ist abhängig vom TNM – bzw. Dukes – Stadium. (6) (siehe Tabelle 1.1)

Vor allem, wenn es bereits zu Metastasen gekommen ist, sinkt die 5-JÜR sehr schnell ab; solche Absiedlungen stellen also den wichtigsten prognostischen Faktor dar. Darum ist es dringend erforderlich, Ursachen und Ablauf der Metastasierung besser zu verstehen, um somit betroffenen Patienten bessere Chancen im Kampf gegen den Krebs einzuräumen. In dieser Arbeit soll daher aufgedeckt werden, ob Galectin-3 möglicherweise eine Rolle bei der Metastasierung und Invasion von Tumoren spielen könnte.

1.5 Galectin-3

1.5.1 Galectine allgemein

Galectine stellen eine wachsende Familie aus β -Galaktosid-bindenden Proteinen dar. Sie sind zum Einen charakterisiert durch mindestens eine sogenannte Carbohydrate-recognition-domain (CRD), welche eine Affinität zu β -Galaktosiden aufweist. (8) Diese besteht aus zumindest 130 Aminosäuren und ist aus 12 β -Faltblättern aufgebaut. Zum Anderen besitzen Galectine typische Aminosäuresequenzen, sogenannte Conserved-sequence-elements.

Ein besonders interessanter Aspekt dieser Lektine ist, dass sie sowohl Eigenschaften von intra- wie auch von extrazellulären Proteinen aufweisen. (8) So sind sie auch nicht nur im Zytoplasma lokalisiert, sondern werden ebenso im Zellkern, an der Zellmembran sowie im Extrazellularraum gefunden. Bisher wurden 15 verschiedenen Galectine identifiziert. (9) (10)

Die Galectin-Familie wird aufgrund struktureller Merkmale in drei Untergruppen gegliedert. Zum Einen die „Prototype“-Gruppe, zu der die Galectine 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13 und 14 gerechnet werden. Sie liegen zumeist als Monomere mit einer CRD-Domäne vor. Einige können aber auch Dimere bilden und besitzen dann zwei identische CRD-Bereiche, einen pro Untereinheit.

Die zweite Gruppe ist die „Tandem-repeat“-Gruppe mit den Galectinen 4, 6, 8, 9 und 12. Sie sind jeweils aus zwei unterschiedlichen CRD-Domänen aufgebaut, welche durch ein Verbindungsprotein kovalent verbunden sind.

Als besonderes Mitglied der Galectin-Familie bildet Galectin-3 alleine die „Chimera“-Gruppe.

Galektin-Untergruppen

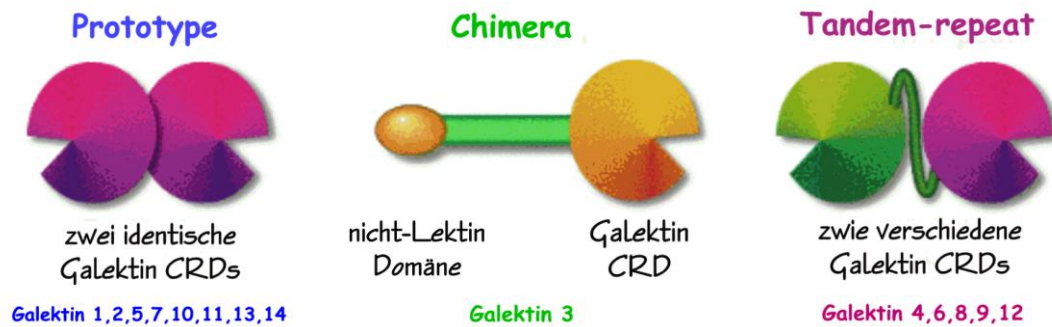


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der drei Untergruppen der Galectin-Familie

Während Galectine der Prototype-Gruppe mit ihren zwei identischen CRDs zwei homologe Kohlenhydrate verbinden, koppeln Mitglieder der Tandem-repeat-Gruppe aufgrund unterschiedlicher CRDs zwei verschiedene Kohlenhydrat-Liganden aneinander.

Galectin-3 dagegen ist im Stande mit Hilfe seiner nicht-Lektin-Domäne Kohlenhydratligenanden mit nicht-Kohlehydraten zu verbinden und ist somit einzigartig unter den Galectinen.

Quelle: Glycoforum: <http://www.glycoforum.gr.jp>

1.5.2 Struktur und Aufbau von Galectin-3

Galectin-3 besitzt eine Vielzahl weiterer Namen, wie Mac-2-Antigen, mL34, hL31, L-29, carbohydrate binding protein 35 (CBP-35) oder eBP/IgE-binding protein.

Die Struktur von Galectin-3 besteht einerseits, wie auch bei den restlichen Galectinen, aus einem Kohlenhydrat-bindenden Anteil, der sogenannten CRD, hier am C-terminalen Ende des Proteins. Andererseits unterscheidet sie sich von der Struktur der übrigen Familienmitglieder durch eine N-terminal lokalisierte Prolin-, Glycin- und Thyrosin-reiche Domäne aus 120 Aminosäuren (11), die mit der CRD verbunden ist und vorwiegend aus kurzen tandem-repeats besteht. (12) (13) Als tandem-repeats werden Teilabschnitte z. B. eines Proteins bezeichnet, die aus mehreren, in gleicher Reihenfolge hintereinander liegenden Kopien von Aminosäuren bestehen.

Diese ungewöhnlichen tandem-repeats tragen möglicherweise zur Multifunktionalität dieses Galectins bei. (13)

Das Galectin-3-Gen LGALS3 findet sich auf dem humanen Chromosom 14q21-22. (14) Es setzt sich aus sechs Exons und fünf Introns zusammen, die insgesamt eine Größe von ca. 17 kb überspannen. (15)

Das fertige Protein hat eine Größe von ca. 30 kDa. (12)

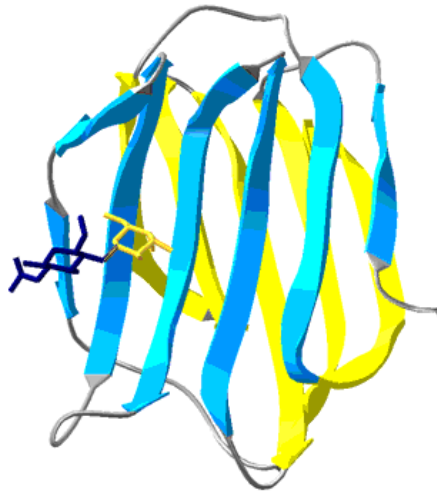


Abbildung 6: Struktur des menschlichen Galectin-3 mit gebundenem *N*-acetyllactosamine (LacNAc)

Die kugelförmige CRD setzt sich aus einem fünfsträngigen (gelbe Pfeile) und einem antiparallel verlaufenden sechssträngigen (hellblaue Pfeile) β -Faltblatt zusammen, die sich in Form eines β -Sandwiches aneinanderlagern. (11)

Strichförmig ist als Ligand LacNAc eingezeichnet, wobei der Galaktose-Anteil gelb und der Glukose-Anteil dunkelblau dargestellt ist.

Quelle: <http://www.imperial.ac.uk/research/animallectins/ctld/images/galectin%203.gif>, Protein Data Bank Struktur ID: 1KJL.

1.5.3 Expression, Sekretion und Funktion von Galectin-3

Galectin-3 wird in Geweben und Zelltypen zahlreicher Spezies exprimiert (16) und findet sich beispielsweise in Epithelzellen, Fibroblasten, dendritischen und Entzündungszellen und wird unter anderem von Monozyten und Makrophagen sezerniert. (13) Dabei ist es als Bestandteil von Mitochondrien, Phagosomen und Exosomen (13) nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern sowie membrangebunden und extrazellulär zu finden.

Galectin-3 pendelt zwischen dem Nucleus und dem Zytoplasma hin und her. Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Phosphorylierung des Galectin-3 für den Transport aus dem Kern verantwortlich ist, wobei wohl vor allem eine Phosphorylierung an Ser-6 diese Translokation bewirkt. (17) Ob nun Galectin-3 vermehrt im Zellkern oder im Zellplasma lokalisiert ist, ist abhängig vom Proliferationszustand der jeweiligen Zelle. Weitere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Aminosäurereste 252-258 des Galectin-3 für den Import in den Kern wichtig sind, während die damit überlappenden Leucin-reichen Reste 240-255 ein Export-Signal enthalten. (18) (19)

Im Allgemeinen werden Galectine im Zytosol an zytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert. (20) Allerdings besitzt Galectin-3 keine hydrophobe Signalsequenz und

wird durch einen nicht-klassischen Mechanismus, unabhängig vom endoplasmatischen Retikulum(ER)-Golgi-Komplex, von den Zellen freigesetzt. (20) (12) (16) Es konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Galectin-3 durch die Blockade mit verschiedenen Reagenzien, die den klassischen Sekretionsweg blockieren, nicht verhindert wird. (20) Außerdem weisen Studienergebnisse darauf hin, dass die Sekretion von Galectin-3 durch Signale veranlasst wird, die in dessen eigener Aminosäuresequenz enthalten sind. (20) Vor allem scheint das N-terminale Ende hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen. Zudem wird als wahrscheinlich angesehen, dass Galectin-3 direkt zur Plasmamembran transportiert wird (20), um dann in Vesikeln, die sich aus dieser Membran ausstülpfen, von der Zelle abgegeben zu werden. Dieser Vorgang wird als „Membrane-blebbing“ oder „Exozytose“ bezeichnet. Galectin-3 wird dann von diesen externalisierten Vesikeln freigesetzt (20) und so in den Extrazellularraum abgegeben. Möglich erscheint ebenso eine direkte Translokation durch die Plasmamembran (8) oder auch eine passive Sekretion durch Zellnekrose.

Galectin-3 weist eine Vielzahl interessanter Funktionen, sowohl intra- als auch extrazellulär auf. Neben β -Galaktosiden, an welche Galectin-3 im Sinne eines klassischen Lektins mit seiner CRD binden kann, fungieren auch Polypeptide, Nukleinsäuren und Lipidmoleküle als Bindungspartner, welche allerdings an spezifische interne Peptidsequenzen gebunden werden. (16) In vielen Fällen ist jedoch nicht das intakte Polypeptid biologisch aktiv, sondern Modifikationen wie durch Metalloproteinasen trunkierte Formen oder an Serin- oder Tyrosinresten phosphorylierte Derivate. (16) Zu der Vielzahl verschiedener Funktionen, die dem Galectin-3 zugesprochen werden, zählen beispielsweise die Beteiligung an der Zell-Zell-Adhäsion sowie der Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix. Ebenso beeinflusst dieses Lektin Zellwachstum und -differenzierung, sowie den Zellzyklus und die Weitergabe von intrazellulären Signalen bis hin zur Apoptose. Auch ist es an Vorgängen der Angiogenese beteiligt und induziert die Migration von Zellen, wie Monozyten, Makrophagen oder Endothelzellen. (13) (16) Weiterhin ist Galectin-3 in die Entwicklung vieler Gewebe und Organe sowie in unspezifische und spezifische Immunreaktionen involviert, und fördert bzw. hemmt die Entstehung und das Wachstum von Tumoren sowie deren Metastasierung. (16) (21)

1.5.4 Galectin-3 und Tumore

Viele Untersuchungen wurden bereits durchgeführt, um die Beteiligung von Galectin-3 bei den unterschiedlichsten Tumoren zu erforschen. Doch trotz unterschiedlicher Ergebnisse zweifelt man nicht an der Beteiligung von Galectin-3 bei der Entstehung, Progression und Metastasierung von Tumoren. So kommt es bei der Transformation von normalen zu Tumorzellen zur Dysregulation der Galectin-3-Expression. (13) Das Galectin-3-Gen beinhaltet ein auf den Tumorsuppressor p53 ansprechendes Element und die Expression von Galectin-3 wird durch p53 vermindert. (13)

Doch obwohl es die genaue Rolle von Galectin-3 noch zu ermitteln gilt, haben mehrere Studien gezeigt, dass die Expression von Galectin-3 positiv mit dem metastatischen Potential einiger tumorigener Zelllinien korreliert. (22)

Neben anderen Tumoren spielt Galectin-3 möglicherweise eine Rolle beim Kolonkarzinom; jedoch wurde sowohl über ansteigendes wie auch abfallendes Galectin-3 im Verlauf der Progression zum metastasierenden Stadium hin berichtet. (22) (23) (24) (25) (26)

Möglicherweise spielt Galectin-3 eine Rolle bei der Metastasierung, indem es eine Aktivierung von Fibroblasten und eine damit verbundene Stromareaktion hervorruft.

Die vorliegende Arbeit soll nun neue Erkenntnisse über die Zusammenhänge von Galectin-3 und der Stromareaktion liefern.

Arbeitsziele

Evaluation der Expression von Galectin-3 bei Kolonkarzinomen in Korrelation mit der Stromareaktion.

1. Zunächst sollte die Expression von Galectin-3 sowohl in kolorektalen Karzinomen als auch in gesunden Darmepithelzellen untersucht werden.

Dazu sollten von 40 verschiedenen Darmproben, die neben gesundem auch tumoröses Gewebe enthielten, je drei Schnitte angefertigt und mittels immunhistochemischen Methoden gefärbt werden, um zu erkennen, ob diese Galectin-3 aufweisen.

Entsprechend ihres Färbeverhaltens sollten die Schnitte dann drei Gruppen zugeordnet werden: Schnitte, auf denen weniger als $\frac{1}{3}$ der Zellen eine Färbung aufwiesen, sollten dabei die erste Gruppe bilden. Der zweiten Gruppe sollten Schnitte zugeteilt werden, deren Zellen sich zu $\frac{1}{3} - \frac{2}{3}$ anfärbten und zur dritten und letzten Gruppe sollten Schnitte mit mehr als $\frac{2}{3}$ angefärbten Zellen gerechnet werden.

Dabei sollten normale und karzinomatöse Zellen getrennt betrachtet und ausgezählt werden.

2. Anschließend sollte gezeigt werden, ob zwischen der Expression von Galectin-3 im normalen Epithel bzw. im Tumorepithel und der durch den jeweiligen Tumor im umliegenden Gewebe ausgelösten Stromareaktion (Desmoplasie) eine Korrelation besteht.

Dazu sollten die gefundenen Werte bezüglich der Anfärbbarkeit der gesunden wie der Karzinomzellen für Galectin-3 mit den jeweiligen Werten für die Desmoplasie verglichen werden.

Außerdem sollte auch die Expression von Galectin-3 im Tumorgewebe mit der im normalen Epithel derselben Darmprobe verglichen werden, um eine eventuell vorliegende Korrelation zu erkennen.

Materialien

3.1 Immunhistologie

Xylol (Isomerengemisch)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Citratpuffer: Chem Mate TM, Target Retrieval Solution	Dako Cytomation, Denmark
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KgaA, Darmstadt
Phosphat-gepufferte Salzlösung 10x Dulbecco`s PBS (Phosphat Buffered Saline)	MP Biomedicals Inc.
Fetales Kälberserum FCS (Fetal Calf Serum)	
Antikörper: Purified Mouse anti-human Galectin-3	BD Biosciences, Pharmingen TM
Antikörper: Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-anti-mouse IgG 1,1 mg/dl	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Soham Cambridgeshire, UK
Avidin-Biotin-Komplex: Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories Inc.
Färbung: Vector NovaRed Substrate Kit	Vector Laboratories Inc.
Fixierung: Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako Cytomation

3.2 Verbrauchsmaterialien

Objektträger: Super FrostRPlus	Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig
Deckgläser 24x60 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Absaugpipetten: CostarRStripette	Corning Inc., Corning, NY, USA
Pipettenspitzen	
Eppendorfcups: 15 ml Conical Tube Blue MaxTMJr.	Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA
Eppendorfcups: 50 ml Conical Tube Blue	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes,

MaxTM	NJ, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

3.3 Geräte

Multipipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettiergerät: Pipetboy acu	Integra Biosciences
Schüttler: HS 250	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik
Mikrowelle: Inverter-System-inside	Panasonic
Reaktionsgläser: Brand Blau/Silber 100 ml	Schott Duran
Reaktionsgläser: Brand Blau/Silber 250 ml	Schott Duran
Reaktionsgläser: Brand Blau/Silber 500 ml	Schott Duran
Mikroskop: Axiovert 40 C	Zeiss

Methoden

4.1 Immunhistologie

Antikörper gehören zu den wichtigsten Bestandteilen unseres Immunsystems. Sie werden im Rahmen der humoralen Immunantwort von Plasmazellen gebildet und zählen zur Proteinfamilie der Immunglobuline. (27) Antikörper bestehen aus je zwei schweren und leichten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind und eine ypsilonförmige Struktur bilden. Durch charakteristische Bindungsstellen erkennen sie bestimmte Substanzen, sogenannte Antigene, und bilden mit ihnen Antigen-Antikörper-Komplexe. Diese Eigenschaft macht man sich in der Immunhistologie, auch Immunhistochemie, Immun- oder Antikörperfärbung genannt, zunutze, um Proteine und andere Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch nachzuweisen.

Aus Körperflüssigkeiten oder in vitro gewonnen, lassen sich diese Antikörper in verschiedenen Untersuchungsverfahren als "molekulare Pinzetten" zum Nachweis der von ihnen spezifisch erkannten Antigene bzw. antigenen Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten im mikroskopischen Bild einsetzen. (27)

Um gewebegebundene Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen, bedient man sich verschiedener, an Antikörper gekoppelter Markersubstanzen, wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen, die ein farbloses Chromogen in ein farbiges Enzymprodukt umwandeln, sowie partikulären und radioaktiven Stoffen.

Man unterscheidet hierbei die direkte von der indirekten Methode. Bei der ersten reagiert ein markierter Antikörper mit dem Gewebsantigen. Bei der indirekten Methode wird zunächst ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht, der selbst nicht markiert, also unkonjugiert, ist. Als nächstes folgt die Zugabe eines zweiten sogenannten Sekundärantikörpers, der nun eine Markersubstanz trägt und gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Eventuell kann auch noch ein Tertiärantikörper hinzugefügt werden. Sekundär- und Tertiärantikörper dienen der Signalverstärkung.

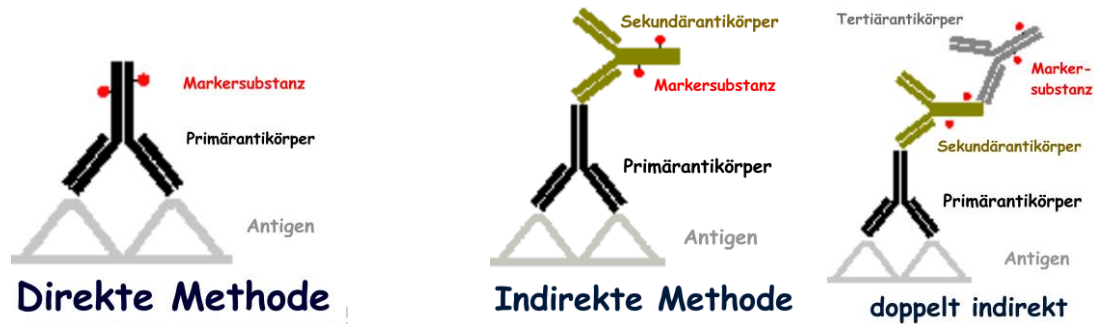


Abbildung 7: Direkte und Indirekte Methoden

Bei der direkten Methode wird nur ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen das gesuchte Antigen wirkt und an den eine Markersubstanz gekoppelt wird.

Die indirekte Methode hingegen verlangt neben dem Primärantikörper noch weitere, gegen diesen gerichtete Immunglobuline, die mit Hilfe einer Markersubstanz sichtbar gemacht werden.

Bildquelle: <http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.htm>

Des Weiteren existiert noch die (Strept-)Avidin-Biotin-Methode, welche bei dieser Arbeit Anwendung fand und bei der man sich die hohe Affinität von Avidin zu Biotin zunutze macht. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß isolierbares Glykoprotein mit 4 Bindungsstellen für Biotin. Zur Verwendung kommen bei dieser indirekten Methode biotinylierte, das heißt mit Biotin markierte, Sekundärantikörper. Anschließend wird enzymmarkiertes Avidin, in Form eines Avidin-Biotin-Enzym-Komplexes (ABC), zugegeben, welches mit der darauffolgenden Enzym-Substrat-Reaktion einen Farbnachweis erbringt. (27) (28)

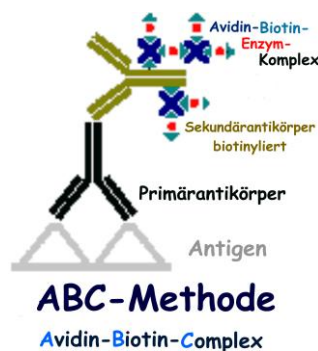


Abbildung 8: ABC-Methode

Bei der ABC-Methode ist der Sekundärantikörper, dessen Antigen der Primärantikörper darstellt, mit Biotin markiert.

Bildquelle: <http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.htm>

Für die vorliegende Arbeit wurden 40 verschiedene Kolonresektate, welche neben gesundem auch karzinomatöses Gewebe enthielten, verwendet und daraus je drei Schnitte gewonnen und zur Fixierung in Paraffin eingebettet.

Anschließend wurden diese Schnitte mittels immunhistochemischen Methoden im Hinblick auf Galectin-3 angefärbt, wie folgt.

Zu Beginn wurden die zu untersuchenden Schnitte zweimal fünf Minuten lang in Xylol und dann jeweils zwei Minuten in 100%igen, nochmals 100%igen, dann 90%igen und abschließend 70%igen Alkohol gelegt, um das zur Fixierung verwendete Paraffin herauszulösen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal zehn Minuten in 1x Citratpuffer bei 250 Watt in der Mikrowelle aufgeköcht.

Die so in der absteigenden Alkoholreihe und im Citratpuffer von Paraffin gereinigten Schnitte wurden dann kurz in 1x PBS gewaschen und für 30 Minuten in 3%igem H_2O_2 bewegt, um die Aktivität der in geringen Mengen vorhandenen endogenen Gewebeperoxidase zu unterdrücken. Im nächsten Schritt folgte erneutes Waschen in 1x PBS für dreimal zehn Minuten. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte danach wiederum 30 Minuten in 20% fetalem Kälberserum (FCS) bewegt. Daraufhin wurden, nach zweimaligem Waschen für je fünf Minuten in 1x PBS, pro Schnitt 600 μl des Primärantikörpers Mouse-Anti-human-Galectin-3 in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen und die Schnitte damit für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert. Der nächste Schritt bestand darin, nach dreimaligem zehn-minütigen Waschen in 1x PBS, den Sekundärantikörper goat-anti-mouse-biotin-gelabelt im Verhältnis 1:500, ebenfalls 600 μl pro Schnitt, aufzutragen. Abermals wurden die Schnitte in der Feuchtkammer für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Schnitte erneut dreimal zehn Minuten in 1x PBS gewaschen und nun der, 30 Minuten zuvor angesetzte, Avidin-Biotin-Komplex aufgetragen und wiederum 30 Minuten in der Feuchtkammer belassen. Anschließend wurden die Schnitte ein letztes Mal dreimal zehn Minuten in 1x PBS gewaschen und dann mit „Nova Red“ gefärbt.

Abschließend erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun, woraufhin die Schnitte eingedeckelt und über Nacht 24 Stunden getrocknet wurden.

4.2 Statistik

Am Anfang wissenschaftlicher Untersuchungen stehen zunächst Hypothesen, also Annahmen über bestimmte Zusammenhänge, welche je nach Forschungsergebnis mit ja oder nein beantwortet werden können, also entweder beibehalten werden können oder verworfen werden müssen. Die Auswertung geschieht mit Hilfe statistischer Tests.

Man unterscheidet diesbezüglich zwischen Nullhypothese H_0 und Alternativhypothese H_1 .

Die Nullhypothese negiert oft die zu überprüfende Annahme und soll mit Hilfe der Untersuchungsergebnisse widerlegt werden, so dass schließlich die Alternativhypothese, also die untersuchte Annahme zutrifft.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von Galectin-3 bei der Stromareaktion von Tumoren untersucht werden. Hierzu wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

Zum Einen, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der Expression von Galectin-3 im normalen sowie im Tumorgewebe und der Stromareaktion. Zum Anderen, dass ein Unterschied besteht zwischen der Galectin-3-Expression im gesunden im Vergleich zum tumorösen Gewebe.

Die Nullhypothesen lauten also zum Einen „Es besteht keine Korrelation zwischen der Galectin-3-Expression im gesunden bzw. im tumorösen Gewebe und der umgebenden Stromareaktion“ und zum Anderen „Es besteht kein Unterschied zwischen der Galectin-3-Expression im gesunden und der im Tumorgewebe“.

Diese Nullhypothesen, oder auch Prüfhypothesen, wurden mit Hilfe des statistischen Mann-Whitney-Tests überprüft.

Der Mann-Whitney-Test, auch Wilcoxon-Mann-Whitney-Test oder Mann-Whitney-U-Test genannt, ist ein parameterfreier statistischer Test zum Vergleich der Mediane zweier unabhängiger Stichproben auf ordinalem Skalenniveau.

Er zählt zu den Rangtests; hierbei werden den einzelnen Elementen der beiden unabhängigen Stichproben m und n jeweils Ränge zugeteilt und daraus die Rangsumme für jede der beiden Stichproben R_m und R_n gebildet. Aus dieser Ranginformation werden dann die Prüfgrößen U_m und U_n berechnet. Die kleinere der beiden Prüfgrößen wird dann bei der Berechnung der Teststatistik verwendet.

Aufgrund ihres Färbeverhaltens wurden die verwendeten Schnitte in drei Gruppen unterteilt und es wurden ihnen entsprechende Maßzahlen zugeordnet. Hierzu wurden pro Schnitt willkürlich drei Ausschnitte, sog. „high power fields“ (HPF), mit einer Vergrößerung von 200 bis 400 ausgewählt und die angefärbten Zellen ausgezählt. Schnitte mit einer Anfärbung von bis zu einem Drittel der Zellen erhielten so die Maßzahl 1, zwischen einem und zwei Dritteln angefärbter Zellen wurde die Maßzahl 2 vergeben und über zwei Dritteln angefärbter Zellen ergab sich schließlich die Maßzahl 3. Aus den Maßzahlen der je drei Schnitte, welche von einem Darmresektat erstellt wurden ergab sich letztlich eine Maßzahl von 1-3 für jedes der insgesamt 40 Präparate.

Diese Werte wurden anschließend zusammen mit den vorliegenden Werten für die Desmoplasie des jeweiligen Tumors mit Hilfe des statistischen Mann-Whitney-Tests verglichen, um so eventuell bestehende Korrelationen zwischen der Galectin-3-Expression im gesunden sowie im tumorösen Darmepithel mit der jeweiligen Desmoplasie, also Stromareaktion, aufzuzeigen, ebenso wie Unterschiede in der Expression von Galectin-3 zwischen gesundem und Tumorgewebe.

Ergebnisse

Nachdem in Voruntersuchungen Galectin-3 als starker Fibroblasten aktivierender Faktor identifiziert werden konnte, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von Galectin-3 auf die Stromareaktion, als Korrelat zur Fibroblastenaktivierung, im Zusammenhang mit Tumoren am Beispiel des kolorektalen Karzinoms untersucht.

Damit sollten neue Erkenntnisse über die Zusammenhänge von Galectin-3-Expression und Stromareaktion sowie einer damit möglicherweise verbundenen Metastasierung gewonnen werden.

5.1 Expression von Galectin-3 im gesunden Darmgewebe

Eine Expression von Galectin-3 zeigt sich bei der hier verwendeten Methode durch eine rote Färbung an.

Im normalen, tumorfreien Gewebe zeigt sich eine Anfärbung, also Galectin-3-Expression, vor allem in den Epithelzellen der Darmschleimhaut, selten ist aber auch eine Färbung in der Lamina propria mukosae zu beobachten.

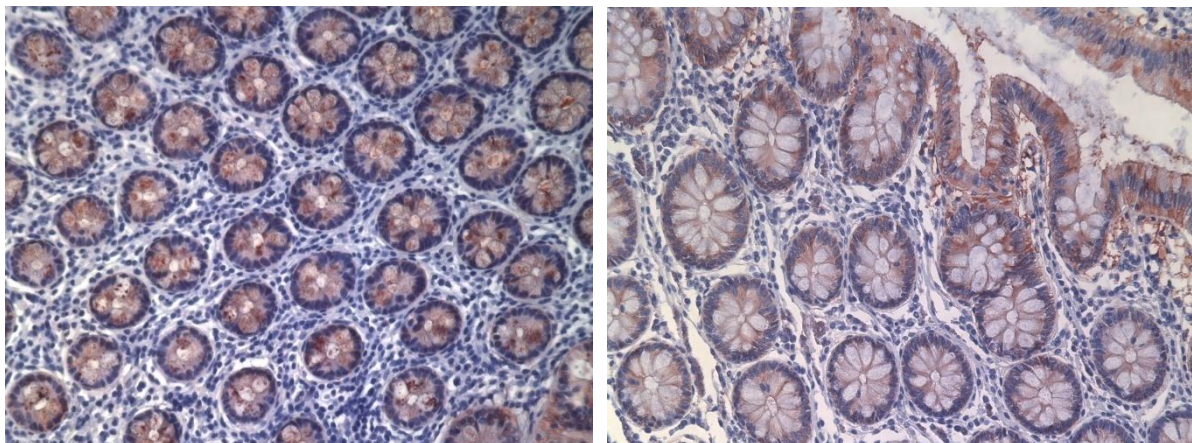


Abbildung 9: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 1

Gut zu erkennen ist die rote Färbung der Epithelzellen. Im rechten Bild ist auch eine Färbung einiger Zellen der Lamina propria zu beobachten.

Des Weiteren ist eine Färbung prinzipiell im gesamten Zellplasma zu erkennen. Hierbei sind Zellen teils gänzlich rot gefärbt; es finden sich jedoch auch Zellen, die eine Färbung eher basal aufweisen, während in anderen die Färbung apikal orientiert ist. Bei letzteren können zum Teil auch apikale, sehr stark eingefärbte kleine Bläschen gesehen werden, welche sich scheinbar von der Zellwand abschnüren. Dies könnte evtl. ein Hinweis auf das sog. Membrane-blebbing sein (siehe Einleitung und Diskussion).

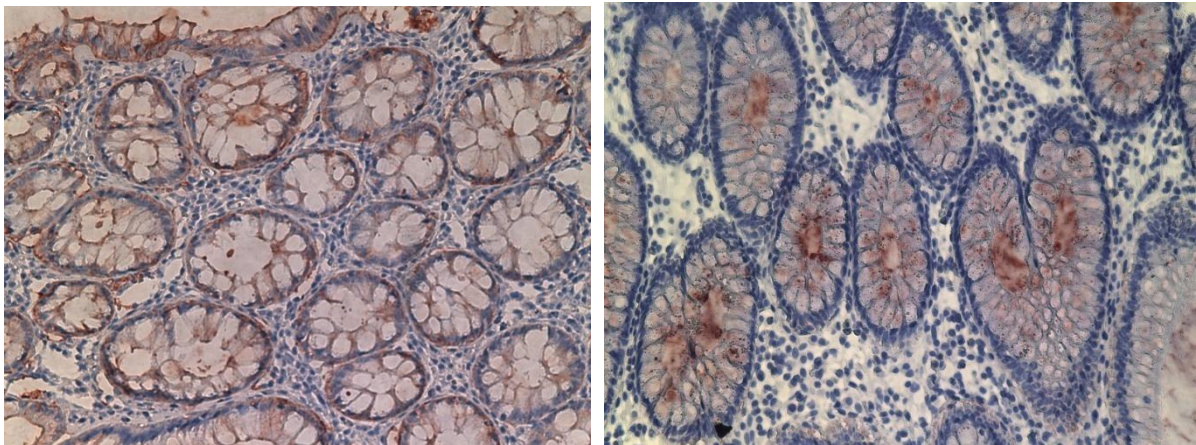


Abbildung 10: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 2

Hier sieht man die unterschiedliche Expression von Galectin-3. In den meisten Zellen erkennt man eine einheitliche Anfärbung, manchmal ist diese jedoch eher apikal, also zum Darmlumen hin orientiert, wie rechts zu sehen

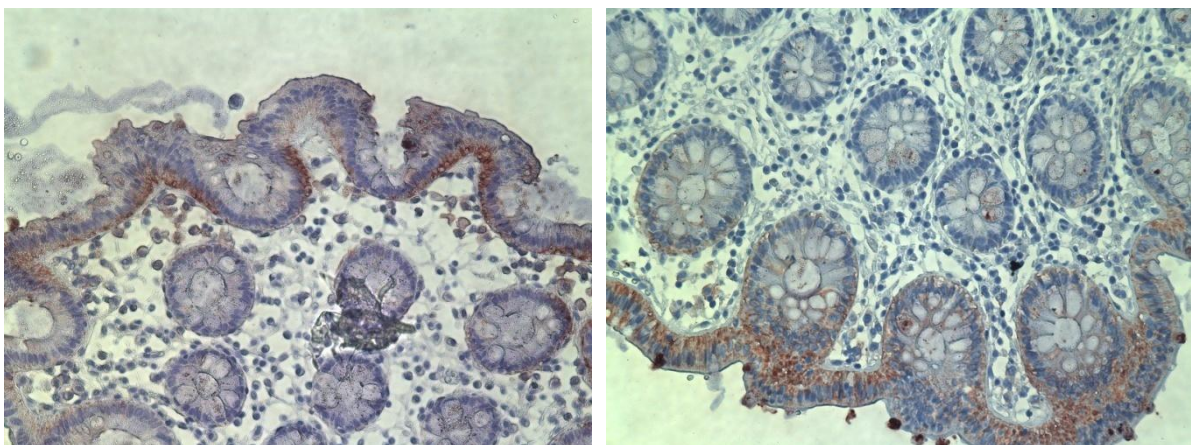


Abbildung 11: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 3

Links zeigt sich eine basale Verteilung der Färbung, also Galectin-3-Expression, rechts scheinen sich kleine rote Bläschen von den Epithelzellen abzuschneiden; evtl. ein Hinweis auf das sog. Membrane-blebbing

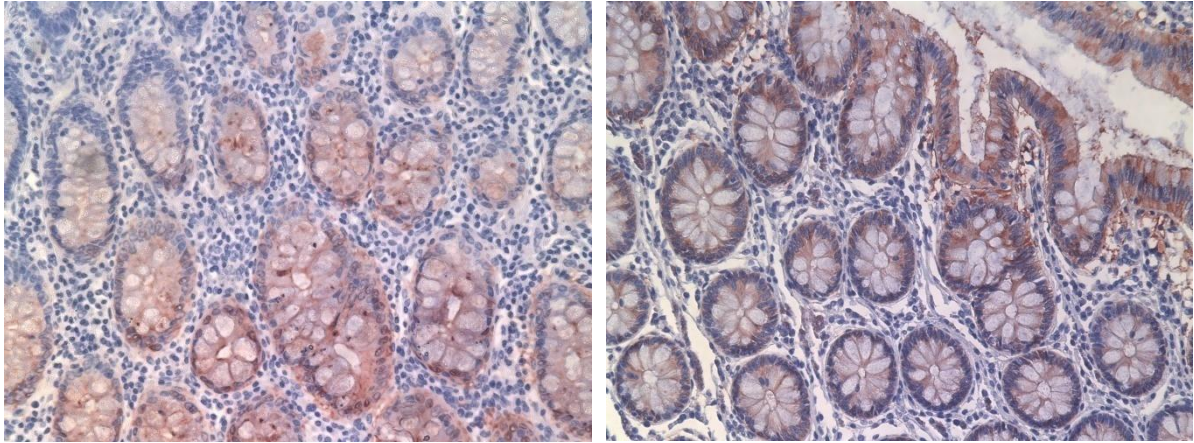


Abbildung 12: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 4

Nicht immer färben sich alle Stellen bzw. Krypten eines Schnittes gleichmäßig an, bedingt durch unterschiedlich getroffene Schnittebenen und Artefakte.

Neben rot eingefärbten Mukosazellen zeigt sich eine Färbung zum Teil auch in den dazwischen eingestreuten schleimproduzierenden Becherzellen sowie auch im Darmlumen. Eine Sezernierung von Galectin-3 ist zwar bekannt, in diesem Fall handelt es sich jedoch am Ehesten um beim Schneiden ins Darmlumen abgeschilferte Epithelzellen.

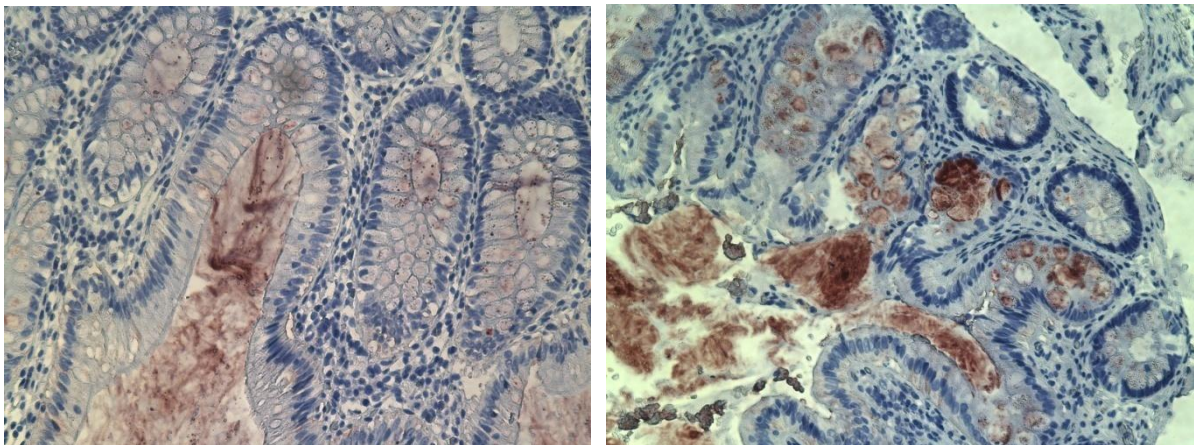


Abbildung 13: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 5

Auch Färbungen im Darmlumen sind zu sehen, am Ehesten entstanden durch Abschlüferung von Darmzellen, möglicherweise aber durch Sezernierung von Galectin-3?

Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Zellkerne auf allen Schnitten von der Färbung ausgespart bleiben.

5.2 Expression von Galectin-3 im Tumorgewebe

Auch im tumorös veränderten Gewebe kann man eine Färbung vor allem in den Tumorepithelzellen beobachten, wobei auch hier die Zellkerne keine Färbung aufweisen. Daneben sind selten, wie auch im gesunden Gewebe, vereinzelte Zellen in der Lamina propria mukosae rot eingefärbt. Diese liegen bevorzugt in direkter Nachbarschaft zu ebenfalls gefärbten Epithelzellen.

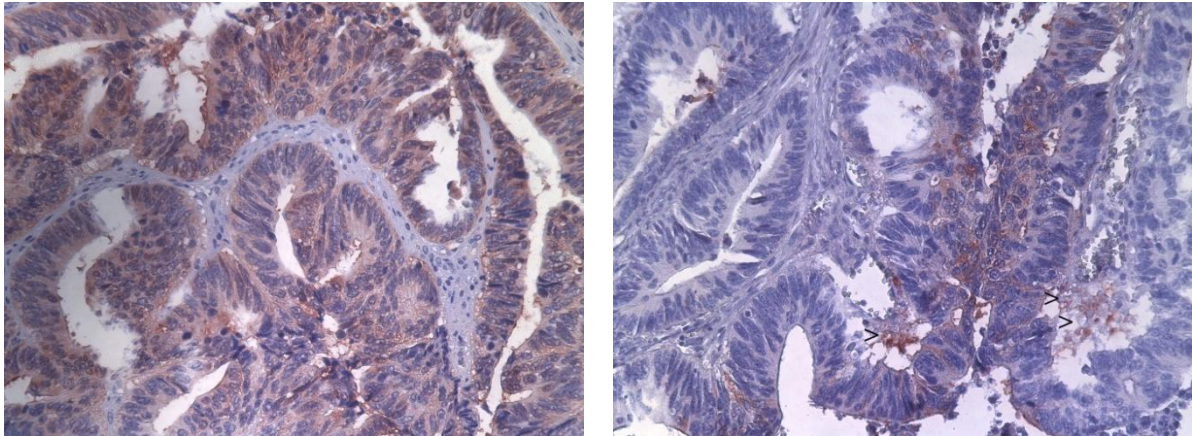


Abbildung 14: Galectin-3-Expression im Tumorgewebe 1

Auch im Tumor färben sich bevorzugt Epithelzellen rot, die Zellkerne bleiben auch hier ausgespart.

Wie im gesunden Gewebe weisen auch die Tumorepithelzellen oft eine Anfärbung im gesamten Zellplasma auf, es zeigt sich jedoch häufiger als im gesunden Gewebe eine vorwiegende Färbung apikaler Zellplasmaanteile; auch hier teils mit stark eingefärbten kleinen Bläschen, jedoch nicht in dem Maße wie bei den Färbungen von normalem Epithel. Basale Anteile sind im Tumorepithel dagegen nicht rot gefärbt.

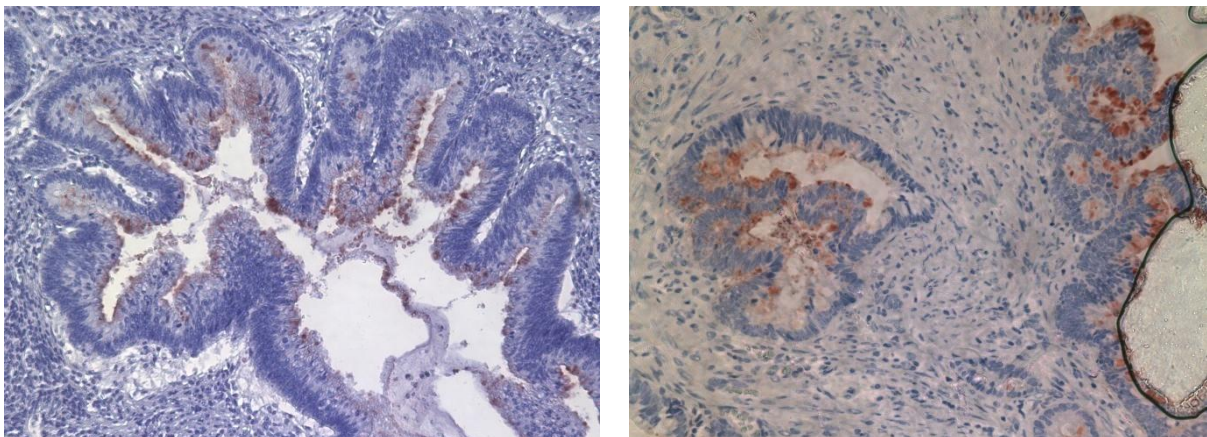


Abbildung 15: Galectin-3-Expression im Tumorgewebe 2

Mehr als im gesunden Darmepithel sieht man eine Orientierung der Färbung hin zum Darmlumen, selten sind auch hier kleine Bläschen zu erkennen.

Des Weiteren zeigt sich auch auf den Bildern vom Tumorepithel eine Rotfärbung im Darmlumen.

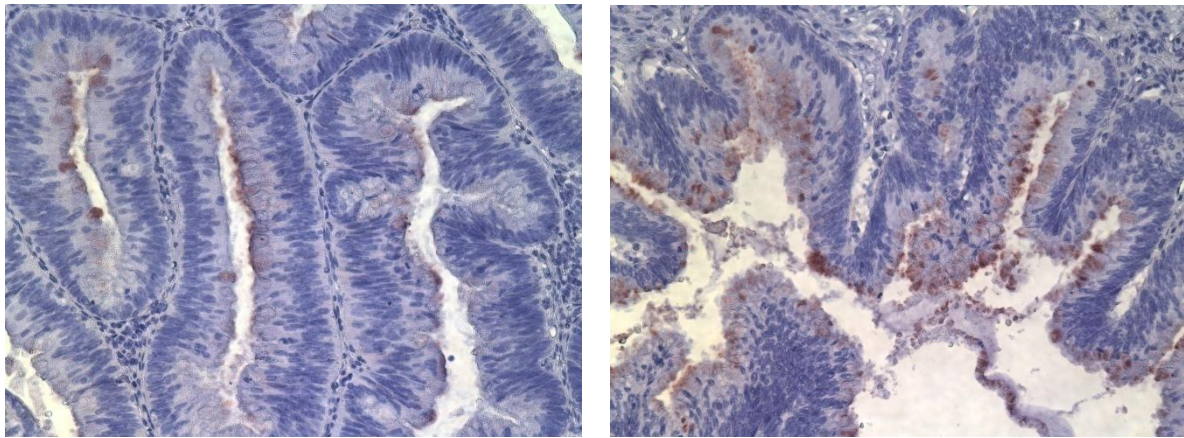


Abbildung 16: Galectin-3-Expression im Tumorgewebe 4

Auch auf den Schnitten mit Tumorgewebe sieht man eine Färbung im Lumen, nicht ganz so stark wie beim gesunden Gewebe.

5.3 Desmoplasie und eine Korrelation zur Galectin-3-Expression

Die entscheidende Frage, nicht nur in dieser Arbeit, ist nun, ob eine Korrelation besteht zwischen der Galectin-3-Expression im Darm- bzw. Tumorepithel und dem Grad der Desmoplasie/Stromareaktion und diesbezüglich auch der Metastasierung des jeweiligen Tumors, um hieraus eventuell einen Ansatz für neue Therapien in der Tumorthherapie zu gewinnen.

Schon beim einfachen Beobachten und Vergleichen der einzelnen Färbungen und entsprechendem Grad der Tumordesmoplasie ergibt sich der Eindruck, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von Galectin-3 und dem Grad der Desmoplasie eines Tumors gibt.

Um diesen subjektiven Eindruck zu objektivieren, wurden, wie oben bereits ausführlich erklärt, den Schnitten je nach Stärke der Anfärbung verschiedene Maßzahlen und entsprechende Mittelwerte zugeordnet und diese mit Hilfe eines statistischen Tests, dem Mann-Whitney-Test, mit dem Desmoplasiegrad verglichen.

Der Vergleich von Anfärbung im Tumorepithel mit der entsprechenden Desmoplasie ergab hierbei keine Signifikanz. Dies bedeutet, dass die anfangs aufgestellte

Nullhypothese „Es besteht keine Korrelation zwischen der Expression von Galectin-3 im Tumorgewebe und der Stromareaktion“ beibehalten wird. Siehe hierzu auch Tabelle 2. Es zeigt sich also, wie bereits vermutet, keine Korrelation zwischen der Galectin-3-Expression eines Karzinoms und der durch dieses Karzinom im umliegenden Gewebe ausgelösten Stromareaktion und Fibroblastentätigkeit. Eine vermehrte Expression von Galectin-3 im Kolonkarzinom führt also nicht zu einem vermehrten bindegewebigen Umbau des umgebenden Gewebes.

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test			
Tu-Färbung	Ränge		
	Desmoplasie	N	Mittlerer Rang
	1,00	7	8,86
	3,00	10	9,10
	Gesamt	17	
	Statistik für Test (Gruppenvariable: Desmoplasie)		
	Tu-Färbung		
	Mann-Whitney-U	34,000	
	Wilcoxon-W	62,000	
	Z	-0,147	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,883	
	exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.)) (nicht für Bindungen korrigiert)	0,962	

Tabelle 2: Desmoplasie und eine Korrelation zur Galectin-3-Expression 1

Der Vergleich von Färbung im Tumorgewebe und entsprechendem Desmoplasiegrad erbringt Signifikanzwerte über 0,05, was einer Korrelation zwischen beiden entgegen spricht.

Auch im Vergleich der Färbung von normalem Epithel mit dem Desmoplasiegrad des entsprechenden Karzinoms konnte keine Signifikanz bezüglich der Anfärbbarkeit und somit der Expression von Galectin-3 gefunden werden. Siehe auch Tabelle 3.

Dies bedeutet also, dass auch hier die zu Beginn aufgestellte Nullhypothese „Es besteht keine Korrelation zwischen Galectin-3-Expression im gesunden Darmgewebe und der

Stromareaktion des entsprechenden Tumors“ beibehalten wird und kein Zusammenhang gezeigt werden konnte zwischen der Stärke der Galectin-3-Expression des gesunden Gewebes und der in der Umgebung des Tumors ausgelösten Stromareaktion. Einfach gesagt bedeutet dies, dass durch mehr/weniger Expression von Galectin-3 nicht eine entsprechend vermehrte/verminderte Stromareaktion und dadurch höhere Invasivität und bessere Möglichkeit der Metastasierung des Karzinoms ausgelöst wird. Oder anders herum kommt es durch bösartigere Kolonkarzinome nicht zu einer Mehr-Expression von Galectin-3 im gesunden Epithel mit daraus resultierender Fibroblastenaktivierung und Stromareaktion. Es zeigten sich bei allen Desmoplasiegraden sowohl starke als auch schwache bis hin zu keiner Färbung, sprich Galectin-3-Expression, der Zellen.

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test			
Ränge			
No-Färbung	Desmoplasie	N	Mittlerer Rang
	1,00	6	9,42
	3,00	10	7,95
	Gesamt	16	
Statistik für Test (Gruppenvariable: Desmoplasie)			
Tu-Färbung			
Mann-Whitney-U		24,500	
Wilcoxon-W		79,500	
Z		-0,658	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		0,511	
exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.)) (nicht für Bindungen korrigiert)		0,562	

Tabelle 3: Desmoplasie und eine Korrelation zur Galectin-3-Expression 2

Auch im Vergleich von Anfärbung im gesunden Darmepithel und Desmoplasie des entsprechenden Karzinoms zeigt sich eine Signifikanz über 0,05. Somit konnte auch hier kein Zusammenhang belegt werden.

Letztlich konnte also kein Zusammenhang zwischen der im gesunden oder auch tumorösen Epithel ausgelösten Galectin-3-Expression und der Stromareaktion, bzw. indirekt der Invasivität und Metastasierungsbereitschaft, von Kolonkarzinomen gezeigt werden.

Weiterhin fiel beim Vergleich der Färbungen jedoch auf, dass normales Epithel generell häufiger eine Färbung aufwies als tumorös verändertes Epithel, unabhängig vom Desmoplasiegrad. Durch die statistische Berechnung mit dem Mann-Whitney-Test konnte diesbezüglich tatsächlich ein signifikanter Unterschied zwischen der Anfärbung im gesunden Darmepithel und der Färbung des Tumorepithels festgestellt werden.

Siehe hierzu auch Tabelle 4.

Die Nullhypothese „Es besteht kein Unterschied zwischen der Galectin-3-Expression im gesunden im Vergleich zum Tumorgewebe“ wird also zu Gunsten der Alternativhypothese verworfen.

Dies wiederum entspricht einem wesentlichen Unterschied der Galectin-3-Expression im normalen Darmgewebe im Vergleich zum Karzinom.

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test				
Ränge				
Färbung	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	Normales Gewebe	32	40,84	1307,00
	Tumorgewebe	35	27,74	971,00
	Gesamt	67		
Statistik für Test (Gruppenvariable: Gruppe)				
			Färbung	
Mann-Whitney-U			341,000	
Wilcoxon-W			971,000	
Z			-3,132	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)			0,002	

Tabelle 4: Desmoplasie und eine Korrelation zur Galectin-3-Expression 3

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnte im Vergleich der Anfärbbarkeit von gesundem und karzinomatösem Gewebe eine Signifikanz von 0,002 errechnet werden. Dies zeigt einen wesentlichen Unterschied zwischen der Expression von Galectin-3 im normalen und im Tumorepithel.

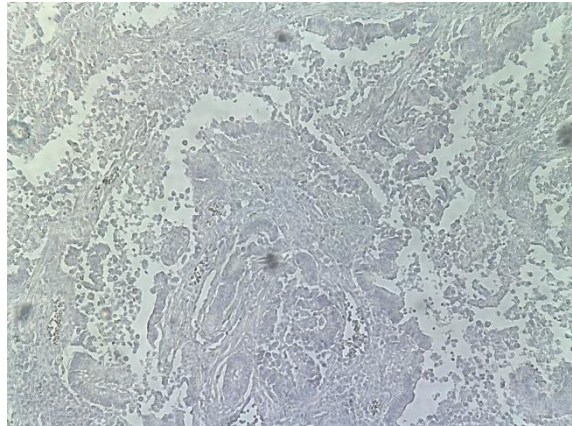
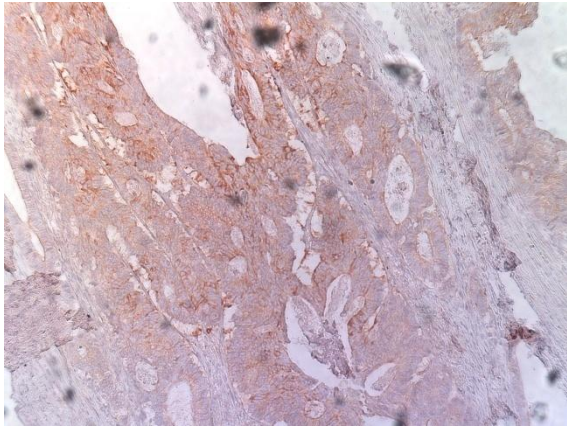


Abbildung 17: Vergleich Desmoplasie Grad 2

Diese beiden Bilder stammen von verschiedenen Karzinomen, die jedoch denselben Desmoplasiegrad aufweisen. Auffällig ist die starke Anfärbung im linken Bild, während sich im rechten keine gefärbten, also Galectin-3 exprimierenden Zellen finden.

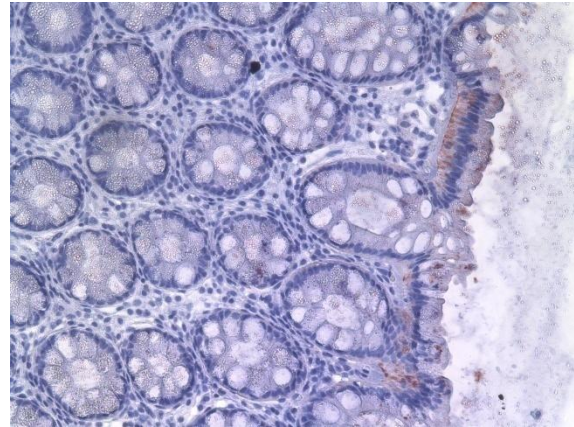
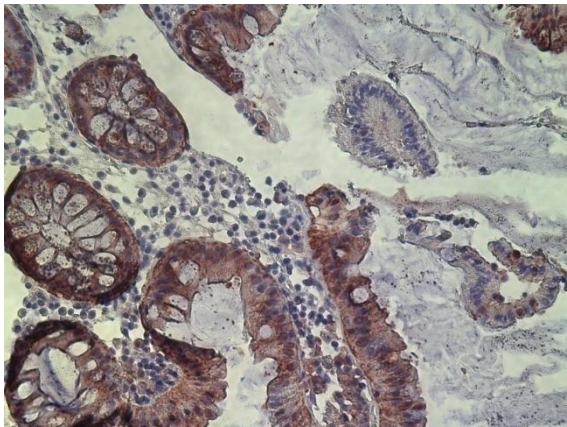


Abbildung 18: Vergleich Desmoplasie Grad 1,5

Diese beiden Aufnahmen zeigen gesundes Darmepithel aus unterschiedlichen Schnitten, also aus der Umgebung verschiedener Tumoren. Obwohl sich beide Karzinome in ihrem Desmoplasiegrad gleichen, fällt die Färbung des benachbarten unveränderten Darmepithels ganz unterschiedlich aus.

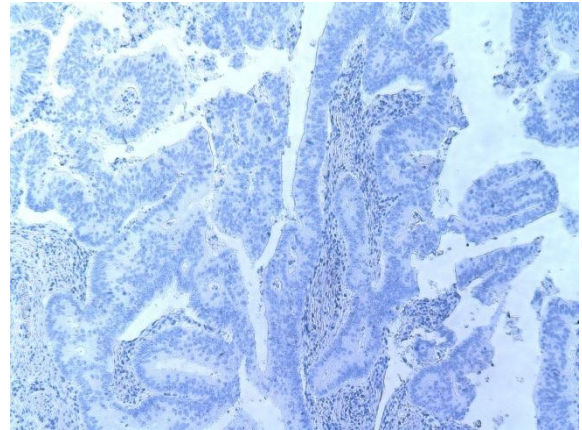
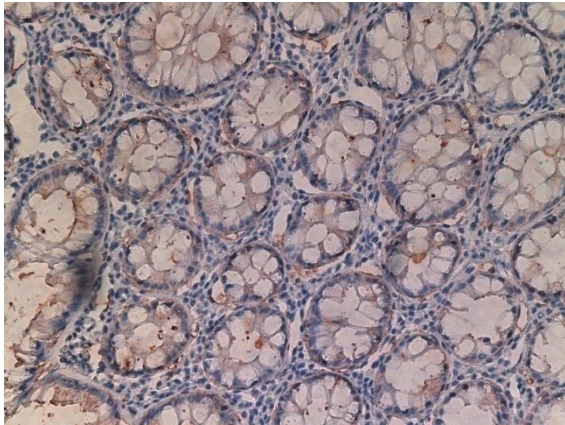


Abbildung 19: Vergleich Desmoplasie Grad 1

Hier werden ein Bild mit gesundem Epithel (links) und eines mit tumorös verändertem Epithel gegenübergestellt; beide Bilder stammen vom selben Schnitt. Deutlich zu erkennen ist die rote Färbung im normalen Gewebe, während sich die karzinomatösen Zellen nicht färben.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass sich die Expression von Galectin-3 in Zellen mit der Umwandlung zu Tumorzellen signifikant verändert, vom mikroskopischen Aspekt zeigt sich eine verminderte Anfärbung von Tumorepithel. Dabei spielt es jedoch keine Rolle, wie sehr entdifferenziert die Tumorzellen bereits sind bzw. wie ausgeprägt deren Stromareaktion ist.

Das heißt also, es konnte kein Zusammenhang, weder positiv noch negativ, zwischen der Stärke der Galectin-3-Expression und dem Grad der Desmoplasie von Kolonkarzinomen nachgewiesen werden.

Es konnte dementsprechend nicht bewiesen werden, dass eine stärkere oder auch verminderte Galectin-3-Expression in gesundem oder tumorösem Darmepithel zu mehr oder weniger Invasivität und Metastasierungsbereitschaft von Kolonkarzinomen führt.

Proben-Nr.	Normales Epithel	Desmoplasie	Tumor-epithel
1	1,22	1	1,00
2	1,50	2	1,00
3	2,33	2	2,89
4	1,22	3	
5		2	1,00
6	1,44	2	1,11
7	1,50	2	1,00
8	1,11	2	1,00
9	1,33	2,5	
10	1,44	2	1,22
11	1,22	2	1,00
12	1,00	2	1,00
13	1,00	1,5	1,00
14	1,00	3	1,00
15	1,00	2	1,00
16	2,78	1	1,00
17	1,00	1	1,00
18	1,33	1,5	1,56
19	1,00	1	1,00
20	1,00	1,5	1,00
21		2	1,00
22	2,67	1,5	1,00
23	1,00	1,5	1,00
24	1,00	2,5	1,00
25		2,5	1,11
26	1,00	2,5	
27	1,00	3	
28	1,00	1	1,00
29	1,78	2	1,00
30		1	1,00
31		3	1,00
32		3	1,00
33	1,67	3	
34		3	1,00
35	1,00	3	1,00
36	1,00	2,5	
37		2,5	1,00
38	1,78	1	1,22
39	1,11	2	1,22
40		3	1,00
41	1,44	2,5	1,11

Aufgeführt sind die verwendeten durchnummerierten Gewebeproben mit den zugehörigen Werten für die Galectin-3-Expression, sowohl im gesunden als auch im karzinomatösen Gewebe, und der jeweils zugehörige Desmoplasiegrad.

Einige Proben enthielten nur gesundes Gewebe; diesen wurde Kontrollgewebe aus dem jeweiligen Tumor gegenübergestellt.

Bei einzelnen Schnitten erzielten die HPFs so unterschiedliche Werte, dass diese Schnitte nicht in die Untersuchung eingingen.

Tabelle 5: Desmoplasiegrade und Werte für Galectin-3-Expression

Diskussion

Durch moderne medizinische Verfahren und Methoden können in der heutigen Zeit Tumoren oft frühzeitig entdeckt und die Chance auf Heilung damit erhöht werden. Doch nicht immer ist dies möglich, oft werden erst fortgeschrittene Stadien diagnostiziert und wenn es bereits zu Metastasen gekommen ist, sind die Heilungsaussichten meist sehr schlecht. Darum ist ein zentrales Anliegen medizinischer Forschung die Vorgänge bei Tumorwachstum und Metastasierung besser zu verstehen um künftig betroffenen Patienten besser helfen zu können.

Hier rückte u.a. Galectin-3, ein β -Galactosid-bindendes Glykoprotein aus der Familie der Lektine, in den Fokus der Wissenschaft. Galectin-3 hat zahlreiche Funktionen, sowohl im Inneren von Zellen als auch im Extrazellularraum. So spielt es zum Beispiel eine Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, reguliert Zellzyklus und Apoptose und wurde mit Tumorwachstum und Metastasierung in Verbindung gebracht. (21)

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, ob Galectin-3, das als starker Fibroblasten-aktivierender Faktor von einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird, eine Beteiligung an der Stromareaktion von Tumoren aufweist und so möglicherweise zu deren Metastasierung beitragen kann. Dazu wurden Schnitte von 40 Kolonkarzinompräparaten mit unterschiedlicher Desmoplasie, also unterschiedlich starker Stromareaktion im umgebenden Gewebe, immunhistologisch gefärbt und mit Hilfe des statistischen Mann-Whitney-Tests auf eventuelle Korrelationen zwischen Galectin-3-Expression, sowohl im gesunden wie auch im neoplastisch veränderten Gewebe, und der Stromareaktion untersucht.

6.1 Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel und Tumorepithel

Zunächst wurden die einzelnen Schnitte im Hinblick darauf untersucht, ob und wo sich eine Galectin-3-Expression zeigt.

Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl im gesunden als auch im karzinomatösen Darmgewebe vor allem von den Epithelzellen Galectin-3 exprimiert wird, wie es unter anderem auch in der Gruppe von Malathy P.V. Shekhar et. al. erwähnt wird (22), wobei diese allerdings Zelllinien von Brustepithelzellen („breast epithelial cells“) verwendeten, nicht primäres Material.

In weiteren Arbeiten konnte festgehalten werden, dass die Expression und Lokalisation von Galectin-3 von der Art des Gewebes, dem Zelltyp und der Differenzierung der Zellen abhängt. (29)

So war in der hier vorliegenden Arbeit zu sehen, dass sich die Galectin-3-Expression oft apikal, im normalen Darmepithel manchmal auch basal, orientierte. Eine apikale Lokalisation von Galectin-3 wurde auch schon von Margaret E. Huflejt et. al. am Beispiel von Kolon-Adenokarzinom-T84-Zellen beschrieben (30), die auch beschreibt, dass das Verteilungsmuster in den Zellen variabel ist und vom Zustand der jeweiligen Zelle abhängt. So fand sie Galectin-3 vor allem an Lokalisationen von Zell-Zell-Kontakten eher apikal orientiert.

Diesbezüglich war in der hier vorliegenden Arbeit auffällig, dass sich im Tumorepithel, im Gegensatz zum gesunden Darmepithel, keine basale sondern nur eine apikale Expression von Galectin-3 zeigte, was möglicherweise durch einen unterschiedlichen Stoffwechsel- bzw. Aktivierungszustand von gesunden und neoplastischen Zellen zu erklären ist. Evtl. deutet dies auf eine stärkere Fähigkeit von Tumorzellen zur Bildung von Zell-Zell-Interaktionen hin und kann ein Hinweis für das Metastasierungspotential von Karzinom-Zellen sein. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied in der apikalen Anordnung von Galectin-3 im Zusammenhang mit unterschiedlich ausgeprägter Stromareaktion der jeweiligen Tumoren festgestellt werden. Es konnte also nicht gezeigt werden, dass bei vermehrter apikaler Galectin-3-Anordnung auch eine vermehrte Stromareaktion stattfand.

Außerdem konnten auf einigen Schnitten, vor allem im gesunden Darmepithel, an der luminalen Seite kleine stark angefärbte Bläschen beobachtet werden sowie farbige Schlieren im Darmlumen.

Dies könnte die These von einer Sekretion durch das sogenannte „Membrane-blebbing“ bzw. Exozytose, wie es schon in der Einleitung erwähnt wurde, unterstützen. Dabei wird es als wahrscheinlich angesehen, dass Galectin-3 direkt zur Plasmamembran transportiert wird (20), um dann in Vesikeln, die sich aus dieser Membran ausstülpfen, von der Zelle abgegeben zu werden. Galectin-3 wird dann von diesen externalisierten Vesikeln freigesetzt (20) und so in den Extrazellularraum abgegeben.

Möglich erscheint hier jedoch ebenso eine passive Sekretion durch Zellnekrose, welche auch zum Beispiel durch die Aufarbeitung des Materials und die Aufbringung auf Objektträger verursacht worden sein kann. Allerdings wurde eine Sekretion von Galectin-

3 schon in verschiedenen anderen Untersuchungen vorbeschrieben und gezeigt, dass es durch einen nicht-klassischen Mechanismus, unabhängig vom endoplasmatischen Retikulum(ER)-Golgi-Komplex, von den Zellen freigesetzt wird. (20) (12) (16)

Zudem ist zu sehen, dass die Zellkerne auf allen Schnitten von der Färbung ausgespart bleiben. Allerdings konnte Galectin-3 in anderen Arbeiten auch schon im Zellkern nachgewiesen werden. Eventuell ist die hier nicht darzustellende Expression im Zellkern Resultat der Kerngegenfärbung mit Hämalaun, da dadurch eine rote Färbung im Zellkern überdeckt werden könnte. Allerdings ist diese Gegenfärbung nötig um den Schnitt im Hinblick auf Intra- und Extrazellularraum besser beurteilen zu können.

6.2 Galectin-3 und Tumoren

Bisher wurden viele Anstrengungen unternommen um Tumorerkrankungen zu behandeln, doch leider ohne bislang das Problem der Metastasierung, also die am meisten lebensbedrohliche Komponente von Tumoren, kontrollieren zu können. (29) Untersuchungen lassen vermuten, dass Galectine eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Tumoren spielen; sie werden unter anderem in Verbindung gebracht mit neoplastischer Transformation, dem Überleben von Tumorzellen, Angiogenese und Metastasierung. (31) Des Weiteren können sie Immun- und Entzündungsprozesse modulieren und haben so eventuell eine Schlüsselrolle im Hinblick auf ein Entkommen der Tumorzellen vor der Immunabwehr des Körpers. (31)

Hier wird vor allem Galectin-3, wie bereits in der Einleitung ausführlich erläutert, mit sehr vielen Vorgängen innerhalb und außerhalb der Zelle in Verbindung gebracht. Und dabei ist vor allem die mögliche Beteiligung an Tumorprogression und Metastasierung durch die Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (22) von großem medizinischen Interesse.

Bislang wurden einige Untersuchungen durchgeführt, die die Beteiligung von Galectin-3 bei Tumoren unterschiedlicher Gewebe untersuchten, wobei viele gegensätzliche Ergebnisse gewonnen worden sind, so dass bislang das genaue Verständnis von Galectin-3 bei der Beteiligung von Tumorentstehung, -wachstum und Metastasierung fehlt.

Galectin-3 wurde sowohl positiv wie auch negativ mit Tumorprogression korreliert. Es wurde also sowohl über Anstieg als auch Abfall der Galectin-3-Konzentration während der malignen Entwicklung verschiedener Tumoren berichtet. (22) (32) (33) (34)

Eine direkte Korrelation der Expression von Galectin-3 wurde beispielsweise mit zunehmendem metastasierenden Potential von Fibrosarkomen und Melanomen beschrieben, im Gegensatz dazu zeigte sich ein Abfall von Galectin-3 zum Beispiel beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom, Ovarial- oder Mammakarzinom. (22)

Im Zusammenhang mit Kolonkarzinomen wurden sowohl Anstieg als auch Abfall der Galectin-3-Konzentration während der Entwicklung hin zum metastasierenden Stadium beschrieben. (22) (26)

So fanden beispielsweise Zhang et. al. eine positive Korrelation von Galectin-3 – Expression mit Invasion, geringer Differenzierung und Metastasierung von Kolonkarzinomen (23), während Andre et. al. eine verminderte Galectin-3-Konzentration bei Kolonkarzinomen bei denen bereits Lymphknotenmetastasen entstanden waren zeigen konnten. (24)

In der vorliegenden Arbeit konnte zwar ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von Galectin-3 im gesunden im Vergleich mit tumorösem Darmepithel gezeigt werden, wie auch schon Zhang et. al. feststellen konnten (23), eine Korrelation zur Stromareaktion und damit Invasivität des Kolonkarzinoms konnte jedoch weder negativ noch positiv gezeigt werden.

Zwar lässt sich eine Tendenz hin zur negativen Korrelation vermuten, die statistische Auswertung erbrachte jedoch keine Signifikanz diesbezüglich; weder im gesunden Darmepithel noch im tumorösen.

6.3 Ausblick

Obwohl nun in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang, ob positiv oder negativ, zwischen dem Grad der Desmoplasie des umgebenden Gewebes eines Tumors und seiner Galectin-3-Expression gezeigt werden konnte, war doch ein signifikanter Unterschied zwischen der Galectin-3-Expression von normalem, gesunden Gewebe und der Galectin-3-Expression im Tumorgewebe zu beobachten.

Diese nachweisbare Änderung der Galectin-3-Expression in der Entwicklung vom gesunden zum Tumorgewebe lässt den Schluss zu, dass Galectin-3 in irgendeiner Weise eine Komponente im Entwicklungsprozess von Tumoren darstellt und trotz bisher vieler unterschiedlicher Untersuchungsergebnisse ist eine Mitwirkung von Galectinen als Regulatoren von Tumorprogression und -metastasierung durch die Beteiligung an vielen

verschiedenen biologischen Vorgängen wie Zell-Aggregation, Apoptose, Zell-Migration oder Angiogenese unbestritten.

Daher befassen sich viele Untersuchungen mit der Möglichkeit über Galectine in den Prozess der Tumorprogression und vor allem auch die Metastasierung, als den am meisten therapielimitierenden Faktor, einzugreifen und so durch einen gemeinsamen Ansatzpunkt eine Therapieoption für mehrere unterschiedliche Tumoren zu finden, also unabhängig von der Tumorart ein gemeinsames therapeutisches Vorgehen zu ermitteln.

Vor allem Galectin-1 und -3 sollen laut neueren Forschungen eine Rolle bei Zell-Wachstum und Apoptose spielen und an Zell-Migration und Angiogenese beteiligt sein. (9)

So konnte z.B. ein Abfall der Galectin-3-Expression mit der Tumorprogression und –metastasierung bei Mamma-, Ovarial- oder Prostatakarzinomen festgestellt werden, bei Schilddrüsen- und Magenkarzinomen hingegen zeigte sich ein Anstieg der Galectin-3-Expression mit zunehmendem Metastasierungspotenzial. (35) Ebenso zeigte sich eine positive Korrelation im Tierversuch mit Mäusen für Melanom und Fibrosarkom. (35)

Im Zusammenhang mit Kolonkarzinomen wurden sowohl Anstieg als auch Abfall der Galectin-3-Konzentration während der Entwicklung hin zum metastasierenden Stadium beschrieben. (22) (26)

In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Galectin-3, welches im Kreislauf von Karzinompatienten deutlich erhöht ist, die Adhäsion von Tumorzellen an makro- und mikrovaskuläre Gefäßendothelien steigert, ebenso wie die transendotheliale Invasion der Tumorzellen (21), also einen entscheidenden Beitrag zur Metastasierung leistet.

Wenn es also zu einem Anstieg von Galectin-3 kommt und dadurch die Entwicklung hin zum Karzinom sowie die Metastasierung begünstigt oder ausgelöst wird, könnten Galectin-Inhibitoren neue Therapieoptionen gegen Tumore darstellen. (9)

Zudem wurde darüber berichtet, dass eine Überexpression von Galectin-3 in Tumorzellen diese Zellen vor Anoikis, einem Prozess, der Zelladhäsion und Apoptose verbindet, schützt. (9)

Iurisci et. al konnten in diesem Zusammenhang etwa Allyl-Lactosid als Hemmstoff von Galectin-3 und dadurch auch als Inhibitor tumorassoziierter homotypischer Zell-Aggregation und Apoptose ermitteln. (9)

Unlängst haben weitere Studien den Effekt von modifiziertem Citrus-Pectin (MCP), einer wasserlöslichen Polysaccharidfaser aus Zitrusfrüchten, untersucht, welche spezifisch Galectin-3 bei Tumorwachstum und –metastasierung hemmt. (9) Es konnte

diesbezüglich herausgefunden werden, dass oral verabreichtes Citrus-Pectin carbohydratevermitteltes Tumorstadium, Angiogenese und Metastasierung hemmt, indem es Interaktionen zwischen Galectin-3 und spezifischen Carbohydrat- also Kohlenwasserstoff-Liganden unterbricht. (9) (36)

In weiteren Arbeitsgruppen konnte eine signifikante Verminderung von Lebermetastasen beim Colonicarcinom unter Behandlung mit modifiziertem Citrus-Pectin (MCP) festgestellt werden. (37)

Für einen sinnvollen Einsatz von Galectin-3-Inhibitoren ist jedoch eine positive Korrelation zwischen Galectin-3-Expression und Tumorstadium notwendig.

6.4 Zusammenfassung

Galectin-3 ist ein β -Galactosid-bindendes Protein aus der Familie der Lectine, dem zahlreiche Aufgaben innerhalb und außerhalb der Zelle zugeschrieben werden; insbesondere im Hinblick auf Zellwachstum und -differenzierung, Zellzyklus sowie Zell-Zell-Interaktionen. Vor allem wegen der Beteiligung an dieser Vielzahl von Zellfunktionen rückte Galectin-3 schon seit längerem in den Fokus der Forschung, besonders auch bezüglich seiner möglichen Beteiligung bei Tumorstadien.

Ziel der vorliegenden Arbeit war diesbezüglich eine Evaluation der Expression von Galectin-3 bei Colonicarcinomen in Korrelation mit der Stromareaktion.

Es konnte jedoch mittels immunhistochemischen Färbemethoden im Hinblick auf die Stromareaktion in tumorumliegendem Gewebe als Maß für das Metastisierungspotenzial des jeweiligen Tumors weder eine positive noch eine negative Korrelation mit der Galectin-3-Expression festgestellt werden.

Nichts desto trotz zeigte sich aber ein signifikanter Unterschied in der Galectin-3-Expression von gesundem im Vergleich zum tumorösen Gewebe, wodurch schlussfolgernd eine Beteiligung von Galectin-3 bei der Entwicklung von gesunden hin zu Tumorzellen anzunehmen ist.

Bisherige Untersuchungen zeigten abhängig von der Tumorart Anstieg oder auch Abfall des Galectin-3 mit zunehmender Tumorstadium; teils liefern sie auch kontroverse Ergebnisse, z.B. beim Colonicarcinom.

Eine Beteiligung von Galectin-3 bei der Entwicklung von Tumoren gilt jedoch allgemein als unbestritten, so dass es als ein möglicher Angriffspunkt bei der Tumorstadium immer mehr an Bedeutung gewinnt. Ein Ansatzpunkt sind hier z.B. Galectin-3-Inhibitoren, die

eine Interaktion des Lectins mit seinen Liganden blockieren, wie z.B. Allyl-Lactosid oder modifiziertes Citrus-Pectin, welches bereits beim Prostatakarzinom oral eingesetzt wird. Diesbezüglich besteht jedoch noch ein sehr hoher Bedarf an weiterer Forschung und Klärung der tatsächlichen Wirksamkeit sowie auch unerwünschter Wirkungen um schließlich eine effektive Therapie im Kampf gegen Tumore anbieten zu können.

Literaturverzeichnis

1. tumor.know-library.net. [Online]
2. **Pschyrembel, W.** *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Berlin : de Gruyter, 2002. S. 830.
3. **Gross, R. und Schmidt, C. G.** *Klinische Onkologie*. Stuttgart : Thieme, 1985.
4. www.krebsinformation.de. [Online] Krebsinformationsdienst Deutsches Krebsforschungszentrum.
5. **Prof. Dr. Greten, H., et al.** *Innere Medizin Verstehen - Lernen - Anwenden*. Stuttgart : Thieme, 2005. S. 756-762.
6. **Baenkler, H.-W., et al.** *Innere Medizin, Duale Reihe*. Stuttgart : Thieme, 2001. S. 1097-1102.
7. **Buchta, M., Höper, D. W. und Sönnichsen, A., et al.** *Das Hammerexamen*. München : Urban & Fischer, 2006. S. 227-229.
8. **Leffler, H.** Introduction to Galectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 1997, Bd. 9, 45, S. 9-19.
9. **Iurisci, I., et al.** Synthetic Inhibitors of Galectin-1 and -3 Selectively Modulate Homotypic Cell Aggregation and Tumor Cell Apoptosis. *Anticancer Research*. 2009, 29, S. 403-410.
10. **Thijssen, V. L.J.L., et al.** Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood*. 2007, Bd. 110, 8.
11. **Seetharaman, J., et al.** X-ray Crystal Structure of the Human Galectin-3 Carbohydrate Recognition Domain at 2.1-Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, Bd. 273, 21, S. 13047-13052.
12. **Henderson, N., et al.** Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Medical Sciences*. 2005.
13. **Fu-Tong Liu, M.D., Ph.D. und Dan Hsu, Ph.D.**
http://web.mit.edu/glycomics/moleculepages/cbp/galectins/gal3_human/. [Online] consortium for functional glycomics, 6. 9 2003.
14. **Raimond, J., et al.** Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region 14q21-22. *Mammalian Genome*. 1997, Bd. 8, 9.
15. **Kadrofske, M. M., Openo, K. P. und Wang, J. L.** The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys*. 1998, Bd. 349, 1, S. 7-20.
16. **Prof. Dr. Seitz, J. und al., et.** *Funktion von Galectin 3 im Reproduktionstrakt*. Marburg : Philipps-Universität Marburg, 2007.
17. **Takenaka, Y., et al.** Nuclear Export of Phosphorylated Galectin-3 Regulates its Antiapoptotic Activity in Response to Chemotherapeutic Drugs. *Mol Cell Biol*. 2004, Bd. 24, 10, S. 4395-4406.
18. **Davidson, P. J., et al.** Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm I. Conditions and signals for nuclear import. PubMed.
19. **Sy, L., et al.** Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm II. Identification of the signals for nuclear export. PubMed.
20. **Mehul, B. und Hughes, R. C.** Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *Journal of Cell Science*. 1997, Bd. 110, S. 1169-1178.
21. **Zhao, Q., et al.** Circulating Galectin-3 Promotes Metastasis by Modifying MUC1 Localization on Cancer Cell Surface. *Cancer Research*. 2009, Bd. 69, 17.
22. **Shekhar, M., et al.** Alterations in Galectin-3 Expression and Distribution Correlate with Breast Cancer Progression. *American Journal of Pathology*. 2004, Bd. 165, 6, S. 1931-1941.
23. **Zhang, N., Ding, Yo und Liang, L.** Association of galectin-3 expression with biological behaviors of human colorectal carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2006, Bd. 26, 12, S. 1685-1689.

24. **Andre, S., et al.** Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galectins and in their. *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology*. 1999, Bd. 125, 8-9, S. 461-474.
25. **Irimura, T., et al.** Increased Content of an Endogenous Lactose-binding Lectin in Human Colorectal Carcinoma Progressed to Metastatic Stages. *Cancer Research*. 1991, Bd. 51, S. 387-393.
26. **Lotz, M. M., et al.** Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc. National Academy of Science*. 1993, Bd. 90, S. 3466-3470.
27. pathologie-online.de. [Online] <http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php>.
28. mta-labor.info. [Online] http://www.mta-labor.info/front_content.php?idcat=39&idart=255.
29. **Akahani, S., et al.** Galectin-3 in Tumor Metastasis. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. Januar 1997, Bd. 9, 45, S. 69-75.
30. **Huflejt, M., et al.** Strikingly Different Localization of Galectin-3 and Galectin-4 in Human Colon Adenocarcinoma T84 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, Bd. 272, 22, S. 14294-14303.
31. **Liu, F.-T. und Rabinovich, G. A.** Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2005, 5, S. 29-41.
32. **Iurisci, I., et al.** Concentrations of Galectin-3 in the Sera of Normal Controls and Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 2000, 6.
33. **Merseburger, A. S., et al.** Involvement of decreased Galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer. *The Prostate*. 2007, Bd. 68, 1, S. 72-77.
34. **Peng, W.i, et al.** Tumor-Associated Galectin-3 Modulates the Function of Tumor-Reactive T Cells. *Cancer Research*. 2008, Bd. 68, 17, S. 7228-36.
35. **Takenaka, Y., Fukumori, T. und Raz, A.** Galectin-3 and metastasis. *Glycoconjugate Journal*. 2004, 19, S. 543-549.
36. **Nangia-Makker, P., et al.** Inhibition of Human Cancer Cell Growth and Metastasis in Nude Mice by Oral Intake of Modified Citrus Pectin. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002, Bd. 94, 24.
37. **Liu, H.Y., et al.** Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World Journal of Gastroenterology*. 2008, Bd. 14, 48, S. 7386-91.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesunde Darmschleimhaut 1	8
Abbildung 2: Gesunde Darmschleimhaut 2	8
Abbildung 3: Tumorgewebe	9
Abbildung 4: Metastasierung von Tumorzellen.....	11
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der drei Untergruppen der Galectin-Familie.....	15
Abbildung 6: Struktur des menschlichen Galectin-3 mit gebundenem <i>N</i> -acetyllactosamine (LacNAc).....	16
Abbildung 7: Direkte und Indirekte Methoden.....	23
Abbildung 8: ABC-Methode.....	23
Abbildung 9: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 1	27
Abbildung 10: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 2	28
Abbildung 11: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 3	28
Abbildung 12: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 4	29
Abbildung 13: Galectin-3-Expression im gesunden Darmepithel 5	29
Abbildung 14: Galectin-3-Expression im Tumorgewebe 1	30
Abbildung 15: Galectin-3-Expression im Tumorgewebe 2	30
Abbildung 16: Galectin-3-Expression im Tumorgewebe 4	31
Abbildung 17: Vergleich Desmoplasie Grad 2	35
Abbildung 18: Vergleich Desmoplasie Grad 1,5.....	35
Abbildung 19: Vergleich Desmoplasie Grad 1	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung und Prognose des Kolonkarzinoms	13
Tabelle 2: Desmoplasie und eine Korrelation zur Galectin-3-Expression 1	32
Tabelle 3: Desmoplasie und eine Korrelation zur Galectin-3-Expression 2	33
Tabelle 4: Desmoplasie und eine Korrelation zur Galectin-3-Expression 3	34
Tabelle 5: Desmoplasiegrade und Werte für Galectin-3-Expression	37

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bedanken bei meinem Doktorvater Dr. Gerhard Rogler und meiner Betreuerin Dr. Elisabeth Schnoy, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Ein weiteres Dankeschön geht an die ärztlichen Kollegen der pathologischen Abteilung am Uniklinikum Regensburg für die Bereitstellung der verwendeten Schnitte und die Beratung zur immunhistologischen Färbung.

Vielen Dank auch an Dr. Jörg Marienhagen für die freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Natürlich möchte ich mich auch noch ganz herzlich bedanken bei allen Kolleginnen und Kollegen in den Laboren der Inneren Abteilung sowie der Pathologie für die Herstellung der verwendeten Gewebeschnitte, für die Einarbeitung in immunhistochemische Methoden und Hilfe beim Färben und Mikroskopieren.

Nicht zuletzt gebührt der größte Dank meiner Familie, besonders meiner Schwester Theresa, die mich immer unterstützen und mich auch in verzweifelten Situationen ermahnten nicht aufzugeben und nach vorne zu blicken.